

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis

Fidel Alejandro Aguilar Aguilar

**Avaliação da produção de biometano e bio-hidrogênio a partir de glicerol bruto da
cadeia produtiva do biodiesel e de dejetos da suinocultura**

**Diamantina
2019**

Fidel Alejandro Aguilar Aguilar

Avaliação da produção de biometano e bio-hidrogênio a partir de glicerol bruto da cadeia produtiva do biodiesel e de dejetos da suinocultura

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lílian de Araújo Pantoja

Coorientador: Dr. Joseph Sebastian Pathiyamattom

**Diamantina
2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A283a

Aguilar-Aguilar, Fidel Alejandro.

Avaliação da produção de biometano e bio-hidrogênio a partir de glicerol bruto da cadeia produtiva do biodiesel e de dejetos da suinocultura / Fidel Alejandro Aguilar Aguilar, 2019. 131 p. : il.

Orientador: Alexandre Soares dos Santos

Dissertação (Tese – Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Fermentação escura. 2. Dejetos suínos. 3. Glicerol bruto.

4. Planejamento experimental. 5. Codigestão anaeróbia. 6.

Biocombustíveis. I. Santos, Alexandre Soares dos. II. Título. III.

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 662.6

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa – CRB6/2972

Avaliação da produção de biometano e bio-hidrogênio a partir de glicerol bruto da cadeia produtiva do biodiesel e de dejetos da suinocultura

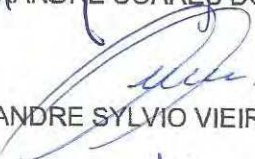
Tese apresentada ao DOUTORADO EM BIOCOMBUSTÍVEIS, nível de DOUTORADO como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre Soares Dos Santos

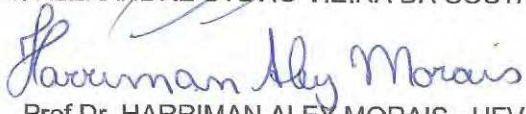
Data da aprovação : 27/08/2019



Prof.Dr. ALEXANDRE SOARES DOS SANTOS - UFVJM



Prof.Dr. ALEXANDRE SYLVIO VIEIRA DA COSTA - UFVJM



Prof.Dr. HARRIMAN ALEY MORAIS - UFVJM



Prof.Dr. EMERSON DELANO LOPES - IFNMG



Prof.Dr.^a SERGIO FRANCISCO DE AQUINO - UFOP



Prof.Dr.^a SILVANA DE QUEIROZ SILVA - UFOP

*"Embora a educação formal seja uma grande vantagem,
não é garantia de sucesso, e sua ausência
não é um obstáculo insuperável"*
(Raymond Albert Kroc 1902-1984)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde e a oportunidade de conhecer as pessoas que fizeram possível esse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Fidel Aguilar e Reyna Aguilar, por terem me dado vida e me ensinar a lutar por tudo o que eu quiser, e às minhas irmãs pelo amor e apoio incondicional.

Agradeço a minha esposa Selene por seu amor e me fornecer seu apoio e confiança. Obrigado pelos conselhos e motivação para terminar o doutorado.

Agradeço à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis por terem aceitado meu projeto de pesquisa de doutorado.

Agradeço profundamente ao Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos e à Prof^a. Lílian de Araújo Pantoja pela grande amizade, pelo apoio durante meus estudos de doutorado em Diamantina, MG, Brasil.

Agradeço à Organização dos Estados Americanos (OEA) e à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) por me permitirem estudar o doutorado. E por ter oportunidade de aprender outras formas de ensino e pesquisa.

Agradeço a todos os meus amigos brasileiros por terem formado parte da minha vida. Sempre estarão nas minhas lembranças, como meus caros amigos.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis por me permitir fazer parte da sua equipe. Tenho grande admiração pelos grandes pesquisadores do programa de pós-graduação, interessantes trabalhos de pesquisa, e pelos grandes seres humanos que são.

Agradeço pela grande ajuda aos meus amigos, ao Prof. Dr. Sandro Luiz Barbosa dos Santos, ao Prof. Dr. Ronnie Von dos Santos Veloso, ao MSc. Philipe Luan Brito, à MSc. Gabriela Maria Pereira Barbosa, à MSc. Jessica Ferreira Matos, ao MSc. Farley Souza Ribeiro Menezes e a todos meus colegas pela paciência e por ter me ensinado a língua portuguesa.

"Embora a educação formal seja uma grande vantagem, não é garantia de sucesso, e sua ausência não é um obstáculo insuperável"
(Raymond Albert Kroc 1902-1984)

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a influência da combinação de glicerol bruto (GB) e de dejetos suíno (DS), efluentes da cadeia produtiva do biodiesel e da indústria da suinocultura, para a produção de bio-hidrogênio e biometano usando lodo anaeróbico de estação de tratamento de esgoto como inóculo. A metodologia de superfície de resposta (MSR) vinculada a planejamento composto central rotacional com três fatores, seis pontos axiais e quatro pontos centrais foi adotada como ferramenta para avaliar os processos de fermentação e codigestão anaeróbica e entender a interação dos efluentes usados como substratos e suas respostas na produção do biogás. Na condição predefinida com relação carbono/nitrogênio (C/N) de 29,37 obteve-se a maior produtividade de biometano, 521,46 mL por grama de DQO (Demanda Química de oxigênio), ao final de 40 dias de fermentação. Consideradas as análises das curvas de superfície, aumentou-se a carga orgânica em 50%, o que resultou, na mistura de 3,75 g L⁻¹ de GB e 15 g L⁻¹ de DS, equivalente a 12,5 g L⁻¹ de DQO, em rendimento de metano de 328,62 mL por grama de DQO, com 61% de metano no biogás. No entanto, concentrações de glicerol bruto maiores que 3,75 g L⁻¹ tiveram efeito negativo no processo de codigestão anaeróbia. Para a produção seletiva de bio-hidrogênio, três tipos de pré-tratamento do inóculo (térmico, ácido e básico) foram avaliados na fermentação escura usando a combinação de glicose, glicerol bruto e dejetos suínos. O método de pré-tratamento térmico foi o mais adequado. O estudo da produção de hidrogênio a partir do uso combinado de glicerol bruto e dejetos suínos resultou em 142,46 mL de hidrogênio por grama de sólidos voláteis (SV) quando se misturou 21,56% de GB (2,75 g L⁻¹) e 78,43% (10 g L⁻¹) de DS, equivalente a C/N de 18,06. O uso combinado de DS e GB apresentou efeito positivo tanto para a redução de DQO, quanto para a obtenção do biometano e do bio-hidrogênio, quando comparados ao uso independente de um ou outro substrato. Portanto, o processo de codigestão dos efluentes aqui avaliados pode ser usado como processo potencial para o tratamento destes efluentes com consequente produção de biocombustíveis gasosos.

Palavras-chave: Fermentação Escura, Dejetos Suínos, Glicerol Bruto, Planejamento Experimental, Codigestão Anaeróbia, Biocombustíveis.

ABSTRACT

In this study was evaluated the influence of the mixture of crude glycerol (CG) and swine manure (SM), effluents from the biodiesel production chain and from the swine industry tests, on the production of bio-hydrogen and bio-methane. The results obtained in this study were submitted to the response surface methodology (RSM), by the central rotational composite planning with three factors, six axial points and four central points, in order to optimize the fermentation processes and understand the interaction of the effluents and the biogas yield. The 12 assays were to evaluate biogas production from anaerobic co-digestion, with different residue combinations (CG/SM) for better response yields. From the results it was possible to observe that the highest bio-methane production was in the order of accumulated 170.00 mL and 521.46 mL per gram of COD added, with the C/N ratio of 29.37, final pH measured of 6, 50, in 40 days. Also, the concentration was increased to 50% the CG/SM concentration, noting that the best results were in the range of 3.75 g L⁻¹ CG and 15 g L⁻¹ SM, 12.5 g L⁻¹ COD added, with the best methane yield of 328.62 mL per gram COD and 61% biogas methane. On the other hand, from the dark fermentation in hydrogen production, the CG/SM mixture was evaluated by applying three pre-treatment methods to the inoculum: heat, acid and basic. This study demonstrates that the heat pretreatment method is still the most suitable method that has been applied mainly in the preparation of hydrogen producing inoculum. The maximum hydrogen production was 17 mL accumulated and 142.46 mL⁻¹ VS added by addition of 21.56% GB (2.75 g L⁻¹) and 78.43% (10 g L⁻¹) of Ds and 18.06 C/N. Thus, it can be confirmed that the combined use of CG and SM has positive effect to increase the application level in terms of volume reduction of organic matter, obtaining bio-methane and bio-hydrogen, which contribute in reducing of environmental pollution.

Keywords: Dark Fermentation, Swine Manure, Crude Glycerol, Experiment Design, Anaerobic Codigestion, Biofuels.

RESUMEN

Este estudio evaluó la influencia de la combinación de glicerol crudo (GB) y estiércol porcino (EP), efluentes de la cadena de producción de biodiesel y de la industria porcina, en la producción de biohidrógeno y biometano. Los resultados obtenidos en este estudio fueron sometidos a la metodología de superficie de respuesta (MSR), mediante la planificación central rotacional compuesta con tres factores, seis puntos axiales y cuatro puntos centrales, para optimizar los procesos de fermentación y comprender la interacción de los efluentes y la respuesta. Además, se evaluaron diferentes ensayos sobre la producción de biogás a partir de la codigestión anaeróbica, con diferentes combinaciones en los residuos de glicerol en bruto. A partir de los resultados, fue posible observar que la mejor producción de biometano fue del orden de 170 ml acumulados y 521.46 ml por gramo de DQO (Demanda Química de Oxígeno) añadida, con la relación carbono / nitrógeno (relación C/N) de 29.37, pH final medido a 6.50 y con tiempo de fermentación de 40 días. Además, la combinación de glicerol crudo y estiércol porcino se incrementó al 50%, señalando que los mejores resultados estuvieron en el rango de 3.75 g L⁻¹ GB y 15 g L⁻¹ EP, 12.5 g L⁻¹ DQO, con el mejor rendimiento de metano de 328,62 ml por gramo de DQO y 61% de metano de biogás. Sin embargo, el aumento de la concentración de GB en más de 3.75 g L⁻¹ tuvo efectos negativos en el proceso de codigestión anaeróbica. Del mismo modo, se evaluaron tres tipos de pretratamiento (térmico, ácido y básico) en la producción de hidrógeno a partir de la fermentación oscura utilizando la combinación de glucosa, glicerol crudo y excretas. Se ha demostrado que el método de pretratamiento térmico fue el método más adecuado para preparar el inóculo productor de hidrógeno. Además, se evaluó la producción de hidrógeno a partir de la combinación de glicerol bruto y estiércol porcino. De los resultados, el mejor rendimiento de hidrógeno fue de 17 ml acumulados y 142.46 ml de SV⁻¹ mediante la adición de 21.56% GB (2.75 g L⁻¹) y 78.43% (10 g L⁻¹) EP y la relación C/N de 18.06. El uso combinado de EP y GB tuvo un efecto positivo tanto para la reducción de DQO como para la producción de biometano y biohidrógeno, constituyendo un proceso potencial para la eliminación de efluentes generados y la producción de biocombustibles gaseosos.

Palabras clave: Co-Digestión Anaerobia, Fermentación Oscura, Diseño Experimental, Excretas Porcinas, Glicerol Bruto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO GERAL	4
2.1	Objetivos específicos	4
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
3.1	Matriz energética	5
3.2	Biogás como biocombustível: O hidrogênio (H ₂) e o metano (CH ₄)	6
3.3	Fontes para produção de biometano e bio-hidrogênio	7
3.3.1	Resíduos orgânicos: <i>dejetos suínos</i>	7
3.3.2	Resíduos orgânicos: <i>glicerol bruto</i>	8
3.4	Produção de hidrogênio	9
3.5	Fotofermentação	10
3.6	Biofotólise direta	11
3.7	Biofotólise indireta	11
3.8	Fermentação escura (Dark Fermentation)	12
3.9	Rota bioquímica da produção de bio-hidrogênio a partir da glicose	13
3.10	Rota metabólica do glicerol.....	15
3.11	Micro-organismos produtores de bio-hidrogênio	18
3.12	Digestão anaeróbia.....	19
3.12.1	Rota metabólica da produção de biometano	20
3.12.2	Hidrólise	21
3.12.3	Acidogênese	22
3.12.4	Acetogênese.....	24
3.12.5	Metanogênese	25
3.13	Inibição do processo anaeróbico.....	26
3.13.1	Inibição por amônia	27
3.13.2	Inibição por metais	27
3.13.3	Inibição por compostos orgânicos	28
3.14	Parâmetros operacionais.....	28
3.14.1	Pressão parcial do hidrogênio.....	28
3.14.2	Temperatura.....	30
3.14.3	pH	30
3.14.4	Relação carbono/nitrogênio (C/N).....	31

3.14.5	Planejamento experimental pela metodologia de superfície de resposta (MSR)	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	Obtenção dos dejetos suínos (DS), glicerol bruto (GB) e inóculo	35
4.2	Caracterização do glicerol bruto, dejetos suíno e inóculo	36
4.3	Produção de biogás da codigestão anaeróbia da combinação de GB e DS.....	36
4.3.1	Avaliação da produção de biogás	36
4.3.2	Aumento da concentração dos substratos na codigestão anaeróbia	38
4.4	Ensaio de produção de hidrogênio	39
4.4.1	Produção de hidrogênio a partir da Glicose, glicerol bruto e dejetos suínos pela codigestão anaeróbia.....	39
4.4.2	Produção de hidrogênio a partir do GB e DS por fermentação escura	42
4.4.3	Avaliação do pré-tratamento térmico e ácido na produção de hidrogênio por fermentação escura	42
4.5	Solução de nutrientes	43
4.6	Quantificação do volume de biogás.....	44
4.7	Variáveis de resposta para quantificação de biogás	45
4.8	Quantificação do glicerol e dos ácidos orgânicos	46
4.9	Caracterização dos gases do processo fermentativo	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia do glicerol bruto e dejetos suínos	47
5.1.1	Caracterização dos substratos e do inóculo.....	47
5.1.2	Caracterização físico-química dos ensaios de codigestão anaeróbia.....	48
5.1.3	Avaliação da produção de biogás	49
5.1.4	Análise da curva de superfície de resposta para a produção de biogás	53
5.1.5	Avaliação da codigestão anaeróbia para o tratamento do glicerol bruto ..	56
5.1.6	Produção de ácidos orgânicos	58
5.2	Produção de biogás com aumento de 50% da carga orgânica de glicerol bruto e dejetos suínos	61
5.2.1	Caracterização do glicerol bruto e dejetos suínos	61
5.2.2	Rendimentos de metano	62
5.2.3	Efeitos da relação GB e DS no desempenho da codigestão anaeróbia	67
5.2.4	Efeito do pH e da amônia no processo anaeróbio da mistura de GB/DS ..	68

5.2.5	Aplicação de amostragem das amplicons e perfis taxonômicos	69
5.2.6	Análise da curva de produção de metano utilizando a superfície de resposta 74	
5.3	Avaliação da produção de bio-hidrogênio a partir de glicose, glicerol bruto e dejetos suínos com três pré-tratamentos.....	77
5.3.1	Caracterização dos substratos e o biogás produzido.....	77
5.3.2	Cinética de produção de hidrogênio	78
5.3.3	Análise de variância.....	79
5.3.4	Metabólitos solúveis da fermentação escura na produção de hidrogênio com diferentes inocula	80
5.4	Produção de hidrogênio de glicerol bruto e dejetos suínos com pré-tratamento térmico e ácido	83
5.4.1	Caracterização dos Substratos	83
5.4.2	Seleção de inóculos com pré-tratamentos térmicos e ácidos para produção de hidrogênio	84
5.4.3	Caracterização Físico-química da mistura dos Substratos (GB/DS)	87
5.4.4	Produção de bio-hidrogênio usando inóculo com pré-tratamento térmico	89
5.4.5	Análise da curva de superfície de resposta na produção de hidrogênio ...	91
5.4.6	Metabólitos solúveis da fermentação escura na produção de hidrogênio com inóculo tratado termicamente.....	95
6	CONCLUSÕES	99
6.1	Conclusões da produção de biogás	99
6.2	Conclusões da produção de hidrogênio	99
6.3	Conclusões gerais	99
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1. Consumo de energias no mundo a partir de diferentes fontes.	5
Figura 3.2. Produção de bio-hidrogênio por fermentação escura e fotofermentação envolvendo diferentes grupos de micro-organismos.	10
Figura 3.3. Produção de hidrogênio e subprodutos: (A) acetato e (B) butirato a partir da fermentação da glicose	14
Figura 2.4. Produção simultânea do acetato e do butirato através da rota metabólica da glicólise com produção de hidrogênio.	15
Figura 3.5. Produção de hidrogênio e ácido orgânicos a partir de glicerol.	17
Figura 3.6. Rota metabólica da produção de biometano a partir de matéria orgânica complexa.	21
Figura 3.7. Degradação do piruvato à ácido propiônico	23
Figura 4.1. Fluxograma das atividades desenvolvidas na etapa de estudo da produção de biogás por digestão anaeróbica e a produção de hidrogênio por fermentação escura. ...	35
Figura 4.2. Aparato utilizado para a determinação do volume de biogás produzido: (I) reator contendo abertura para a saída para o biogás, (II) frasco com solução de NaOH 3 mol L ⁻¹ usado para remoção de CO ₂ e (III) proveta para quantificação de volume de líquido deslocado pela entrada do biogás.	45
Figura 5.1. Perfil da produção de biogás nos diferentes ensaios de codigestão anaeróbia.	50
Figura 5.2. Gráfico de Pareto com os efeitos lineares e quadráticos, além do efeito de interação, dos fatores concentração de GB e DS sobre a produção normalizada de biogás.	54
Figura 5.3. Gráfico de correlação entre os valores preditos pelo modelo ajustado (equação 5.1) e os valores observados experimentalmente.	55
Figura 5.4. Curva de superfície de resposta ajustada para a produção de biogás com as diferentes misturas de GB e DS após os 35° dias de codigestão anaeróbia.	56
Figura 5.5. Gráfico de Pareto com os efeitos lineares e quadráticos, além do efeito de interação, dos fatores concentração de GB e DS sobre a redução da carga orgânica (DQO) após a codigestão anaeróbia.	57
Figura 5.6. Curva de superfície de resposta ajustada para a variável DQO frente às diferentes misturas de GB e DS após o 35° dia de codigestão anaeróbia	58
Figura 5.7. Etapas da produção de biogás durante a biodigestão anaeróbica convencional.	59
Figura 5.8. Cinética do potencial bioquímico de metano da codigestão anaeróbia de dejetos suíno e glicerol bruto aos 70 dias de fermentação.	64
Figura 5.9. Cinética de produção de metano da codigestão anaeróbia de dejetos suíno e glicerol bruto aos 70 dias de fermentação.	66
Figura 5.10. Produção de metano a partir de 100% do GB e 100% do DS na digestão anaeróbica.	67
Figura 5.11. Diversidade microbiana dos seguintes ensaios: (A) Ensaio 2 (6 GB: 22,5 DS), B) Ensaio 5 (3,75 GB: 15 DS), C) Ensaio 7 (10,5 GB: 4,39 DS) e D) Ensaio 9 (10,5 GB: 15 DS).	70

Figura 5.12. Arvore filogenético dos diferentes micro-organismo presentes no processo de co-digestão anaeróbia da combinação de glicerol bruto e dejetos suínos.	72
Figura 5.13. Gráfico da Pareto da análise de variância da porcentagem de metano da codigestão anaerobia de diferentes proporções de GB/DS.	75
Figura 5.14. Curva de superfície ajustada da porcentagem de metano de diferentes concentrações de GB e DS após 70 dias de codigestão anaeróbica.....	75
Figura 5.15. Cinética de produção de hidrogênio dos melhores ensaios da mistura da glicose, glicerol bruto e dejetos suínos com diferentes tipos inoculantes: térmico, ácido e básico.....	79
Figura 5.16. Gráfico de Pareto para os efeitos estimados da glicose, glicerol bruto e dejetos suínos após pré-tratamento do inóculo: A) Térmico, B) Ácido e C) alcalino.	80
Figura 5.17. Principais ácidos orgânicos gerados na produção de bio-hidrogênio com glicose, glicerol bruto e dejetos suínos, com inóculos submetidos pré-tratamentos: A) Térmico, B) Ácido e C) Básico.	82
Figura 5.18. Comparação da cinética de 13 dias (12 horas) de produção de hidrogênio com inóculo submetido ao pré-tratamento térmico (A) e inóculo submetido ao pré-tratamento ácido (B).....	85
Figura 5.19. Perfil dos testes de produção de hidrogênio com 13 dias (12 horas) de fermentação do glicerol bruto e os dejetos suínos.	90
Figura 5.20. Predição de R^2 usando a metodologia de superfície de resposta (MSR).	91
Figura 5.21. Gráfico de Pareto da metodologia de superfície de resposta (MSR), dos resíduos (GB e DS) e a produção de hidrogênio como resposta.	93
Figura 5.22. Resultados do hidrogênio acumulado, aplicando a metodologia de superfície de resposta (MSR). (A) O rendimento de produção de hidrogênio por grama de sólido volátil; (B) produtividade acumulada de hidrogênio, em relação à mistura de glicerina bruta e dejetos suínos.....	93
Figura 5.23. Produção de bio-hidrogênio e ácido orgânicos, por diferentes micro-organismos a partir do glicerol.	96

LISTA DE TABELAS

11	
12	Tabela 3.1. Produção média diária de dejetos líquidos nas fases produtivas dos
13	suínos 8
14	Tabela 3.2. Reações acetogênicas no processo de digestão anaeróbica. 24
15	Tabela 3.3. Reações da produção de metano por vários substratos na digestão
16	anaeróbia..... 26
17	Tabela 4.1. Matriz do delineamento composto central utilizada para o estudo da
18	codigestão anaeróbica empregando glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS)
19	como substrato, contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais. 37
20	Tabela 4.2. Ensaios conduzidos para avaliar os efeitos dos substratos, glicerol
21	bruto (GB) e dejetos suíno (DS), na codigestão anaeróbica de acordo com o
22	preconizado no delineamento composto central..... 37
23	Tabela 4.3. Matriz do delineamento composto central utilizada para o estudo da
24	codigestão anaeróbica empregando glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS)
25	como substrato, contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais. 38
26	Tabela 4.4. Ensaios conduzidos para avaliar o aumento da carga orgânica dos
27	substratos, glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS), na codigestão anaeróbica. 39
28	Tabela 4.5. Matriz do delineamento composto central utilizada na produção de
29	bio-hidrogênio empregando como substrato a glicose, o glicerol bruto (GB) e o
30	dejetos suíno (DS), contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais 40
31	Tabela 4.6. Diferentes ensaios empregados para avaliar os efeitos da
32	combinação da glicose, do glicerol bruto (GB) e do dejetos suíno (DS) na
33	fermentação escura conforme delineamento composto central 40
34	Tabela 4.7. Ensaios experimentais de produção de hidrogênio a partir do glicerol
35	bruto (GB) e os dejetos suínos (DS) com dois diferentes inoculantes 42
36	Tabela 4.8. Matriz do delineamento composto central utilizada para o estudo de
37	produção de hidrogênio empregando glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS)
38	como substrato, contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais. 43
39	Tabela 4.9. Solução de nutrientes utilizada como suplemento nos ensaios
40	fermentativos de produção de biogás..... 44
41	Tabela 5.1. Caracterização físico-química e elementar do glicerol bruto (GB), do
42	dejetos suíno (DS) e do inóculo utilizados no processo de codigestão anaeróbia
43	para produção de biogás 48
44	Tabela 5.2. Resultados da caracterização físico-química dos diferentes ensaios
45	da mistura de substratos para a produção de biogás 49

46	Tabela 5.3. Resultados dos ensaios finais de produção de biogás conduzidos	
47	com diferentes concentrações de glicerol bruto e dejetos suíno em processo de	
48	codigestão anaeróbia.	51
49	Tabela 5.4. Valores dos coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os	
50	parâmetros C/N e I/S e, as variáveis de resposta avaliadas	52
51	Tabela 5.5. Análise de variância (ANOVA) do modelo polinomial aplicado aos	
52	dados de produção de biogás do processo de codigestão anaeróbia da	
53	combinação GB e DS.	54
54	Tabela 5.6. Análise de variância (ANOVA) do modelo polinomial (Equação 4.3)	
55	aplicado aos dados obtidos no processo de codigestão anaeróbia de GB e DS	
56	relativos à redução percentual da DQO.	57
57	Tabela 5.7. Caracterização físico-química dos resíduos orgânicos (GB/DS)	
58	utilizados como substratos na produção de biogás	62
59	Tabela 5.8. Resultados obtidos da codigestão anaeróbia da mistura de glicerol	
60	bruto e dejetos suíno na produção de biogás	63
61	Tabela 5.9. Correlação de Pearson (ρ) dos parâmetros iniciais (x) e resultados (y) no final da	
62	codigestão anaeróbia.	68
63	Tabela 5.10. Concentração de amônia e pH no início e no final da codigestão anaeróbia de	
64	glicerol residual e dejetos suíno.	69
65	Tabela 5.11. Diversidade microbiana apresentada como gênero com menor que 5% de	
66	abundância dos Ensaio 2 (6 GB: 22,5 DS), Ensaio 5 (3,75 GB: 15 DS), Ensaio 7 (10,5 GB:	
67	4,39 DS) e Ensaio 9 (10,5 GB: 15 DS).	73
68	Tabela 5.12. Análise de variância (ANOVA) da porcentagem de metano das diferentes	
69	proporções entre GB/DS na codigestão anaeróbia	74
70	Tabela 5.13. Ensaios de produção de hidrogênio usando três tipos de inoculantes: térmico,	
71	ácido e básico.....	78
72	Tabela 5.14. Características físicas e químicas do glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS)	
73	previamente à produção de hidrogênio	84
74	Tabela 5.15. Produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicerol bruto (GB) e	
75	dejetos suíno (DS) com inoculantes submetidos aos pré-tratamentos térmico e ácido	87
76	Tabela 5.16. Características físico-químicas dos substratos: glicerol bruto (GB), dejetos suíno	
77	(DS) e, GB e GS combinados.....	88
78	Tabela 5.17. Parâmetros finais do processo fermentativo, realizados em ensaios com	
79	diferentes concentrações de glicerol bruto (GB) e dejetos de suínos (DS).	90
80	Tabela 5.18. Análise de variância (ANOVA) do modelo aplicando a metodologia de	
81	superfície de resposta (MSR)	92
82	Tabela 5.19. Resultados dos ensaios experimentais da produção de bio-hidrogênio da mistura	
83	de GB/DS, obtendo respostas como os ácidos orgânicos, produção acumulada de hidrogênio e	
84	pH final.....	98
85		

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a procura por novas fontes de energia tem aumentado em função da dependência por energia convencional (gasolina, gás natural, diesel, carvão, entre outros) ter crescido 47% nos últimos 30 anos (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017; PARMAR *et al.*, 2011; SARMA *et al.*, 2012). Soma-se a isso outros fatores também relevantes, tais como os que se referem aos efeitos negativos da emissão de gases de efeito estufa, resultantes, principalmente, da combustão de combustíveis de origem fóssil. Sendo assim, a conscientização da opção por fontes de energias renováveis é cada vez mais importante para a conservação da qualidade de vida humana (SINGH; WAHID, 2015).

Entre as alternativas ao uso de combustíveis de origem fóssil estão o bio-hidrogênio e o biometano. Estes gases podem ser obtidos a partir de fontes renováveis e têm a vantagem de possuir valor energético que podem alcançar 142 kJ g^{-1} (hidrogênio) e $55,5 \text{ kJ g}^{-1}$ (metano). E ainda, da combustão do hidrogênio e metano, são geradas água e CO_2 como produtos, respectivamente (ELBESHBISHY *et al.*, 2011; NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012; SINGH; WAHID, 2015).

A produção de metano a partir da codigestão anaeróbica é um método de tratamento de resíduos orgânicos, onde os diferentes substratos são misturados e processados em conjunto. Este tratamento é usado para melhorar o desempenho na produção de biogás, e trás vários benefícios para o processo de digestão (ASTALS *et al.*, 2011; KHALID *et al.*, 2011; MATA-ALVAREZ *et al.*, 2014). Entre tais benefícios incluem: alta capacidade de tamponamento, maior disponibilidade nutrientes e relação C/N equilibrada que favorecem a atividade metanogênica e melhoram a taxa de produção de biogás (ASTALS; NOLLA-ARDEVOL; MATA-ALVAREZ, 2012; WANG *et al.*, 2011a, 2011b).

O hidrogênio é obtido por diferentes formas, pela foto-fermentação, biofotólise direta, biofotólise indireta e pela fermentação escura. No entanto, o processo de fermentação escura é o processo mais utilizado na atualidade (YENIGÜN; DEMIREL, 2013). A fermentação escura tem sido realizada utilizando um consórcio bacteriano misto como inóculo, sendo este mais eficiente quando comparado ao uso de culturas puras. O uso desses consórcios bacterianos mistos tem a vantagem de possuir melhor controle do processo e melhor operação por não demandar técnicas onerosas e trabalhosas e ainda, possibilitar o uso de diferentes fontes de matérias-primas (KAN,

2013). O lodo das estações de tratamento de esgoto são fontes potenciais de inóculos para produção de biogás e biohidrogênio, já que possui micro-organismos produtores e consumidores de hidrogênio, tais como as bactérias do gênero *Clostridium* e as bactérias metanogênicas (hidrogenotróficas e acetoclásticas). Na produção de biohidrogênio, alguns autores reportam a necessidade da utilização de pré-tratamentos (térmico, ácido ou básico) que sejam eficazes para o enriquecimento do inóculo pela pressão seletiva de bactérias produtoras de hidrogênio e inibição do desenvolvimento das arqueobactérias (DONG *et al.*, 2010; HU; CHEN, 2007; SAADY, 2013).

O glicerol bruto (GB) é considerado o principal coproduto da cadeia de produção de biodiesel, onde se produz cerca de 10 kg de GB para cada 100 kg de biodiesel (ATHANASOULIA; MELIDIS; AIVASIDIS, 2014; NUCHDANG; PHALAKORNKULE, 2012). Este coproduto possui 55% de glicerol, 17% de ésteres metílicos, 14% de sabões alcalinos, 10% de metanol, 4% de água e outros componentes, por isso é chamado de glicerol bruto (KOLESÁROVÁ *et al.*, 2011; THOMPSON; HE, 2006). Todavia, seu o processo de purificação é dispendioso e não rentável, mas mesmo assim, se purificado, resultaria em uma interessante produção global de glicerol para os mercados tradicionais (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017). Porém, o glicerol bruto tem sido catalogado como substância de fácil degradação em processos biológicos, sendo qualificado como cosubstrato ideal no processo de produção de hidrogênio e metano (ATHANASOULIA *et al.* 2014). Entretanto, as impurezas presentes no glicerol bruto podem afetar significativamente o metabolismo microbiano, pois são consideradas tóxicas, pelo conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa, cloretos e sulfatos (VIANA *et al.*, 2012).

A suinocultura é fundamental no fornecimento de carne no mundo inteiro, a qual tem crescido nos últimos anos, o que de acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2019), tem colocado o Brasil como o quarto maior exportador mundial de carne suína, com um total aproximado de 505 mil toneladas por ano. A criação dos animais em sistemas intensivos e/ou sistemas extensivos preocupa pela poluição causada pela destinação inadequada de seus dejetos (CANCELIER *et al.*, 2015). Uma alternativa de aproveitamento tecnológico dos efluentes da suinocultura (dejetos) e da produção de biodiesel (GB), seria utilizá-los na codigestão anaeróbia e fermentação escura, para produzir metano e hidrogênio, respectivamente, e assim minimizar os efeitos poluentes dos efluentes sem necessidade de tratamento subsequente (HALLENBECK *et al.* 2012; HERNÁNDEZ AND RODRÍGUEZ, 2013).

Zhu *et al.* (2009), em seu estudo de produção de hidrogênio empregando dejetos suínos em combinação com glicose obtiveram rendimento de 209 mL g⁻¹ de sólido volátil. Todavia usaram o controle de pH para manter o pH em 5,3 no sistema. Este estudo demonstrou ser um bioprocesso inviável, pois utilizaram glicose como substrato e ainda, um agente químico para regular o pH.

A estratégia para a geração de biogás e hidrogênio a partir da combinação do glicerol bruto e de dejetos suínos pode suportar a integração de cadeias produtivas importantes, que já convivem no ambiente rural, e que podem se beneficiar econômica e ambientalmente desta proposta. Entretanto, muitos desafios e perguntas remanescem e impescidem de estudos para consolidação de conhecimento e formalização de tecnologias. Desta forma, a presente tese de doutoramento avaliou diferentes combinações do glicerol bruto (GB), oriundo da produção de biodiesel, e dos dejetos suínos (DS), provenientes da suínocultura, na produção de biogás, por codigestão anaeróbica, e de hidrogênio, por fermentação escura. Ambas as tecnologias têm ainda potencial para o tratamento dos efluentes gerados pela suínocultura e produção de biodiesel. Particularmente, foram avaliados parâmetros de processo dos sistemas de produção de biogás e hidrogênio usando metodologia de superfície de resposta (MSR) para inferir a maximização da produção de ambos os gases.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de produção de biogás e bio-hidrogênio a partir da codigestão anaeróbica do glicerol bruto e de dejetos suínos.

2.1 Objetivos específicos

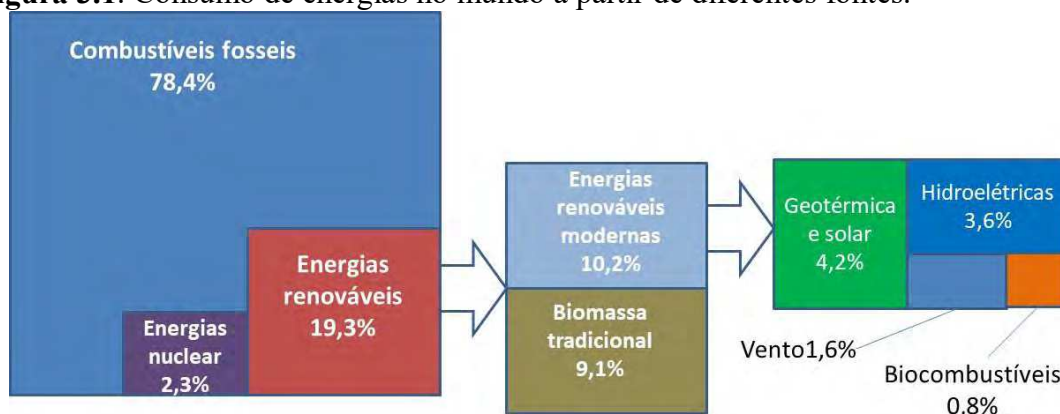
- I. Avaliar a produção de biogás a partir da codigestão anaeróbica de diferentes combinações de glicerol bruto e dejetos suínos.
- II. Avaliar o uso de métodos de tratamento térmico, ácido e básico do inóculo para o enriquecimento microbiano seletivo para a produção de hidrogênio.
- III. Otimizar o processo de produção de hidrogênio e biogás com uso de metodologia da superfície de resposta.
- IV. Identificar a população microbiana presente no lodo anaeróbico proveniente da codigestão anaeróbia da combinação do glicerol bruto e dejetos suínos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Matriz energética

O consumo de energia tem aumentado nos últimos anos devido ao rápido crescimento populacional. Em virtude disso, a demanda global de energia está aumentando a ritmo mais rápido. Os principais recursos energéticos podem ser classificados como recursos nucleares, combustíveis fósseis e fontes renováveis. De acordo com a International Energy Agency (IEA), no ano 2015, a oferta total de energia primária no mundo foi de 13.647 Mtep, onde 1 Mtep (que equivale uma tonelada de petróleo). No entanto, do total de energia consumida no mundo em 2017, Figura 3.1, apenas 19,3% tiveram origem renovável (REN21, 2017). Os biocombustíveis representaram somente 0,8% da energia consumida nesta ocasião.

Figura 3.1. Consumo de energias no mundo a partir de diferentes fontes.



Fonte: Adaptado de REN21, 2017

No Brasil, a principal fonte de energia ainda é fóssil. Segundo os dados do balanço energético nacional do ano 2014, 60,5% da energia usada no Brasil provém de fontes não renováveis com predominância do petróleo, seus derivados e o gás natural. Enquanto o uso de energia renovável representou 39,4% no 2014 (EPE, 2015)

O uso de fontes renováveis para gerar energia no planeta é muito importante e é um tema que tem sido discutido na atualidade, pois o uso da energia nuclear pode causar problemas para a saúde humana e danos ao ambiente. Assim também, o consumo de combustíveis fósseis em grande escala causa impactos ao entorno, como a destruição da camada de ozônio, chuva ácida e alterações climáticas (DEMIRBAS, 2009; STONE *et al.*, 2017).

Os principais biocombustíveis produzidos e consumidos no Brasil são principalmente o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais (o girassol e a soja) e o álcool feito da cana de açúcar. O etanol tem sido usado como combustível no Brasil desde os anos 1920 e em novembro de 1975, seu papel ficou claramente definido a longo prazo, permitindo que o setor privado investisse no aumento de produção. Percebendo isso, as montadoras de veículos passaram a trabalhar no desenvolvimento do motor flexível ao combustível, que poderia operar na mistura de gasolina com etanol (CEZAR; LEITE, 2007). Também, o desenvolvimento do biodiesel como substituto do diesel foi tentado com muito afinho no início do Proálcool, como forma de reduzir ainda mais o consumo de petróleo e de manter o perfil de produção de derivados de acordo com a capacidade das refinarias do país. Em 6 de dezembro de 2004 foi lançado oficialmente o Programa Nacional de Produção de Biodiesel, regulamentado pela Lei no-11.097, de 2005. O programa estabeleceu a obrigatoriedade do uso de 2% de biodiesel misturado ao diesel a partir de 2008 e de 5% a partir de 2013 (CEZAR; LEITE, 2007)

A utilização de fontes alternativas de energia, em particular o biogás, aparece como uma oportunidade de participar da oferta de energia no sistema brasileiro, na forma de geração descentralizada e próxima aos pontos de consumo, por meio de resíduos de processos agroindustriais, que aliadas aos benefícios ambientais amplamente conhecidos, fazem com que o biogás seja uma opção estratégica para o país, dependendo apenas de políticas adequadas para sua viabilização (AGUSTIN *et al.*, 2016).

3.2 Biogás como biocombustível: O hidrogênio (H₂) e o metano (CH₄)

O biogás, o metano e/ou hidrogênio produzidos a partir de processos anaeróbios, trazem impactos positivos ao ambiente, com destaque para a mitigação de emissão de gás carbônico da atmosfera, resultando em um balanço neutro do carbono durante o processo de produção de energia, o que contribui para a redução do efeito estufa. Isso ocorre porque todo o gás carbônico produzido na queima do metano e/ou o hidrogênio será absorvido pelas plantas, os frutos das plantas serão utilizadas nas agroindústrias, e os resíduos orgânicos da agroindústria serão utilizados novamente nos processos de geração do metano e/ou do hidrogênio, mantendo a concentração do gás carbônico atmosférico inalterável (AGUSTIN *et al.*, 2016; LINDMARK *et al.*, 2014)

As vantagens de utilizar o hidrogênio e metano como vetores energéticos estão relacionados com técnicas simplificadas de produção e com os vários campos de aplicação. Por exemplo, a geração de energia motriz pode substituir aos combustíveis fósseis, para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, chuva ácida, a destruição da camada de ozônio e impactos ambientais associados ao consumo e produção de energia (LEE; VERMAAS; RITTMANN, 2010). Também, as tecnologias renováveis de produção de hidrogênio e o metano têm potencial, uma vez que podem ser obtidos de diferentes fontes, tais como esgoto municipal, resíduos agrícolas, industriais e coprodutos da cadeia de produção de biocombustíveis como o biodiesel (MEHER KOTAY; DAS, 2008; URBANIEC; BAKKER, 2015).

3.3 Fontes para produção de biometano e bio-hidrogênio

3.3.1 Resíduos orgânicos: *dejetos suínos*

O Brasil é um dos principais produtores e consumidores de carne suína de acordo à OECD (The Organisation for Economic Co-operation and Development), em 2017 foram consumidas 11,8 kg de carne suína per capita, aproximadamente 3.208 milhões de toneladas no país nesse mesmo ano. De acordo com as tendências, a criação de suínos está aumentando em todos os países, segundo Carvalho e Viana (2011) destacam que os sistemas de criação de suínos também se diferenciam quanto ao manejo e podem ser classificados nos seguintes tipos: sistema extensivo; nesse sistema praticamente não há assistência técnica à produção. Sistema semiextensivo; sistema extensivo de suínos criados ao ar livre e o sistema intensivo de suínos confinados. O sistema caracteriza-se pela utilização de instalações, nas quais os animais são devidamente separados por idade e sexo; e o manejo reprodutivo se realiza por seleção dos animais no plantel. Além disso, eles podem ser classificados como convencionais ou orgânicos. A criação dos animais em sistemas intensivos ou extensivos tem crescente preocupação pelo aumento da poluição pelos dejetos suínos. De acordo com GUIMARÃES *et al.*, (2010) a suinocultura é considerada pelos órgãos de controle ambiental como uma atividade causadora de degradação, sendo enquadrada como de grande capacidade poluidora.

A produção intensiva de suínos tem sérios impactos negativos no ambiente, entre estes, a poluição do ar, solo e água, causados pelos resíduos (gases, dejetos e

urina) produzidos durante o processo de produção. Deste modo, o tratamento dos resíduos da suinocultura é essencial, pois ainda, representam um elevado risco de poluição das águas subterrâneas com nitratos e fosfatos, principalmente, pelo escoamento e a provável filtração, aumentando a eutrofização dos aquíferos. Outras consequências ecológicas estão relacionadas, dentre estas, aquelas por meio a contribuição de nitrogênio na atmosfera, que colabora para a formação de chuva ácida (CANCELIER *et al.*, 2015).

Estudos realizados por Konzen *et al.*, (2003), demonstraram que a quantidade de dejetos produzidos na suinocultura varia em função do porte dos animais, e do sistema de manejo de cada fase produtiva do suíno. Os resultados médios são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Produção média diária de dejetos líquidos nas fases produtivas dos suínos

Categoria	Dejeto	Dejeto + Urina	Dejeto líquido
	(kg dia ⁻¹)		
Suínos de 25 a 100 kg	2,30	4,90	7,00
Porcas em gestação	3,60	11,00	16,00
Porcas em lactação	6,40	18,00	27,00
Leitões na creche	3,00	6,00	9,00
Media	0,35	0,95	1,40

Fonte: Konzen *et al.*, (2003)

3.3.2 Resíduos orgânicos: *glicerol bruto*

No mundo inteiro, a produção de biodiesel tem-se tornado importante, particularmente no Brasil, pois, de acordo com o Portal Brasil, em 2016, a produção brasileira teve uma capacidade de produção instalada e autorizada para operar comercialmente, de 7.123 mil m³ ano⁻¹, o que corresponde a 594 mil m³ mês⁻¹ (ANP, 2017). A região Centro-Oeste liderou a produção de biodiesel no cenário nacional, com a participação de 40%. Já a região sul foi responsável por 38% da produção brasileira, seguida pelo Sudeste, com 12%. As regiões nordeste e norte representaram, respectivamente, 7% e 3% do valor total (ANP, 2017).

A produção de biodiesel gera consideráveis quantidades de glicerol bruto de baixa qualidade, considerada como 10% do total da produção. Neste sentido, cabe

mencionar o estudo de Siles *et al.* (2009), o estudo faz referência a várias estratégias baseadas em transformações químicas e biológicas do glicerol bruto a produtos de maior valor (metano, hidrogênio, 1,3-propanodios, biolubrificantes, entre outros). Neste cenário, a questão atual é centrada no desenvolvimento de novas alternativas de uso para permitir a utilização de glicerol de baixa qualidade. Isso permitirá a viabilidade econômica na indústria do biodiesel. A alternativa proposta neste estudo é o tratamento do glicerol bruto, pelo processo de fermentação e a codigestão anaeróbica, onde o glicerol bruto é utilizado como substrato para obter o metano e o hidrogênio (ASTALS *et al.*, 2010 DROZDYŃSKA *et al.*, 2011; ROBRA *et al.*, 2010).

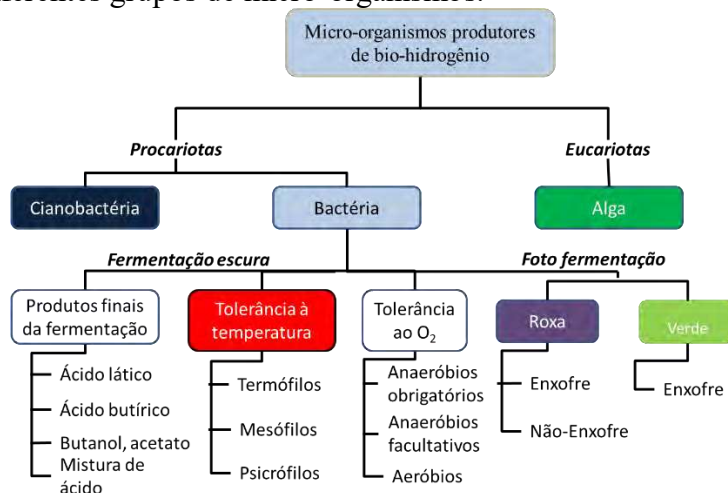
3.4 Produção de hidrogênio

Na atualidade, do total da produção de H₂, 40% é produzido a partir do gás natural, 30% a partir dos óleos pesados e nafta, 18% do carvão, 4% da eletrólise da água e 1% é produzido a partir da biomassa (BALAT, 2008). Para alcançar um sucesso significativo no mercado num futuro próximo, os métodos de produção, distribuição, armazenamento e uso do hidrogênio devem ser melhorados de forma sistemática (DAS; VEZIROGLU, 2008).

Os processos biológicos de produção de hidrogênio têm se tornado importantes, pois dependem principalmente da presença de enzimas produtoras do H₂, as quais catalisam a reação química: $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$. Atualmente três tipos de enzimas que catalisam essa reação são conhecidos como: nitrogenase, Fe-hidrogenase e NiFe-hidrogenase. A enzima Fe-hidrogenase é usada em processos de biofotólise, enquanto os processos de fotofermentação utilizam nitrogenases (BASAK; DAS, 2007). Assim também, existem três grupos diferentes de micro-organismos que estão envolvidos na produção de hidrogênio: as microalgas verdes aeróbicas (eucariotas), cianobactérias, e bactérias, sendo estas bactérias fotossintéticas quimiotróficas anaeróbicas (principalmente procariotas gram-negativa) e as bactérias anaeróbicas (gram-positivas) (DAS; VEZIROGLU, 2008).

Os processos de produção de bio-hidrogênio são classificados como processos de fotofermentação e os processos de fermentação escura, na Figura 3.2 apresenta os diferentes micro-organismos e processos para produzir hidrogênio sob diferentes condições (BHARATHIRAJA *et al.*, 2016; CHANDRASEKHAR; LEE; LEE, 2015; GHIMIRE *et al.*, 2015a).

Figura 3.2. Produção de bio-hidrogênio por fermentação escura e fotofermentação envolvendo diferentes grupos de micro-organismos.



Fonte: CHANDRASEKHAR *et al.* (2015)

3.5 Fotofermentação

Neste processo são utilizadas bactérias foto-tróficas roxas não sulfurosas que produzem hidrogênio, catalisada pela enzima nitrogenasse em condições deficientes em nitrogênio, usando ácidos orgânicos, tais como o ácido acético, o lático e o butírico. O CO₂ pode gerar hidrogênio na ausência de O₂ e na presença de luz (ÖZGÜR, PEKSEL, 2013). A reação de produção de hidrogênio a partir de ácido acético é expressa como (Equação (3.1)):



A enzima hidrogenasse produtora de hidrogênio também intervém neste processo, que compete pelo hidrogênio disponível no meio, reduzindo a atividade da nitrogenasse quando se torna sem substrato. Um dos parâmetros que mais afetam a fotofermentação é a intensidade da luz, já que um aumento na mesma afeta simultaneamente a velocidade de produção e o rendimento de hidrogênio. Como desvantagem o processo demanda o uso de grande área superficial para coletar a luz solar e a produção de hidrogênio é limitada, pois ocorre durante o dia (HALLENBECK *et al.* 2012; KESKIN *et al.* 2011).

3.6 Biofotólise direta

A biofotólise direta é um processo de produção de hidrogênio e oxigênio da fotossíntese da água na presença de luz. Através da fotossíntese, as microalgas verdes e as *Cyanobactérias* são as principais produtoras de hidrogênio, isso ocorre a partir da quebra da molécula de água em condições anaeróbias. Os íons de hidrogênio gerados são convertidos em hidrogênio pelas enzimas hidrogenase e/ou nitrogenase (MIURA, 1995; YU; TAKAHASHI, 2007). De acordo com a Equação (3.2), na quebra da molécula de água são produzidas duas moléculas de hidrogênio e uma molécula do oxigênio. No entanto, o acúmulo de oxigênio inibe a enzima hidrogenase e diminui a produção de hidrogênio. A vantagem desse processo é a produção de hidrogênio a partir de água, em pressão e temperatura ambiente, sendo um processo sustentável e econômico (HALLENBECK *et al.*, 2012; MANISH; BANERJEE, 2008). Como desvantagem tem-se a inibição da enzima hidrogenase pela presença do oxigênio, a necessidade de luz, baixa taxa de produção de hidrogênio e não utiliza de resíduos orgânicos como matéria-prima.



3.7 Biofotólise indireta

Neste processo o hidrogênio é produzido principalmente por cianobactérias e algas verde azuladas, neste processo fotossintético, o gás carbônico é fixado dos substratos que tem hidrogênio, gerando hidrogênio molecular quando os micro-organismos são incubados sob condições anaeróbicas (HALLENBECK; BENEMANN, 2002). No primeiro estágio da Equação (3.3), o gás carbônico é fixado em hidratos de carbono que posteriormente serão fermentados na presença de luz ou através da fermentação escura. Nesta etapa ocorre produção de energia e, liberação de moléculas de hidrogênio como subprodutos (Equação (3.4)) (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; MANISH; BANERJEE, 2008).



As cianobactérias possuem várias enzimas diretamente envolvidas no metabolismo do hidrogênio. A mais importante, a nitrogenase que catalisa a produção de hidrogênio no processo de fixação de nitrogênio. Outra enzima é a hidrogenase, que oxida o hidrogênio que é sintetizado pela nitrogenase e, finalmente, existem hidrogenases bidirecionais que têm a capacidade de oxidar e sintetizar hidrogênio.

A vantagem da biofotólise indireta é a produção de hidrogênio a partir de recursos disponíveis na natureza. Como desvantagem destaca a constante necessidade de luz solar e o custo dos bioreatores para maximizar a presença de luz (AZWAR *et al.*, 2014; YU; TAKAHASHI, 2007).

3.8 Fermentação escura (Dark Fermentation)

A produção de bio-hidrogênio a partir da fermentação escura pode ocorrer com bactérias estritamente anaeróbias ou facultativas, incluindo arqueobactérias e leveduras, em uma ampla gama de temperaturas (BHARATHIRAJA *et al.*, 2016; BRENTNER *et al.*, 2010; RAI; SINGH, 2016).

A fermentação escura tem como resultado o ácido acético, que na estequiometria do processo tem rendimento teórico de 4 moléculas de H₂ por mol de glicose, equivalente a 498 mL H₂ por grama de glicose (0°C, 1 atm). Na via do butirato, apresenta menor rendimento molar do hidrogênio com 2 moles de H₂ por mol de glicose, equivalente a 249 mL de H₂ por grama de glicose (0 ° C, 1 atm) (BHARATHIRAJA *et al.*, 2016; SU *et al.*, 2009).

O acúmulo de ácido acético no meio não implica necessariamente em uma produção mais elevada de hidrogênio, já que várias espécies microbianas podem converter o H₂ e o CO₂ em acetato. Tais espécies incluem micro-organismos acetogênicos que reduzem o CO₂ a acetato a partir da via acetil Co-A. As bactérias acetogênicas como a *Acetobacterium woodii* e a *Clostridium aceticum* podem crescer de forma quimio-organotrófica e autotrófica com redução de CO₂ a acetato utilizando assim, o H₂ como doador de elétrons. A maioria das bactérias acetogênicas que produzem e excretam acetato no metabolismo energético são gram-positivas e muitas são espécies do gênero *Clostridium* ou *Acetobacterium* (DE GIOANNIS *et al.*, 2013; NTAIKOU *et al.* 2010; SAADY, 2013).

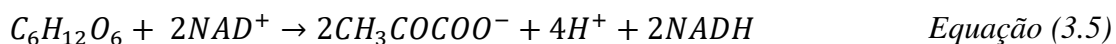
Na fermentação escura com culturas mistas, o propionato, o etanol, e o ácido láctico também podem ser produzidos. As bactérias produtoras de propionato são

bactérias consumidoras do H₂, enquanto as bactérias produtoras de etanol e o ácido láctico estão envolvidos em uma via em que não há consumo de H₂. As principais bactérias anaeróbicas que produzem hidrogênio são as anaeróbicas facultativas do gênero *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e do gênero aeróbico como as *Alcaligenes* e os *Bacillus* (GHIMIRE *et al.*, 2015a; URBANIEC; BAKKER, 2015).

3.9 Rota bioquímica da produção de bio-hidrogênio a partir da glicose

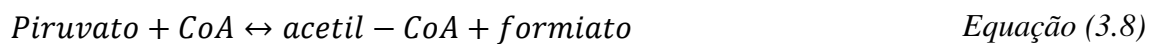
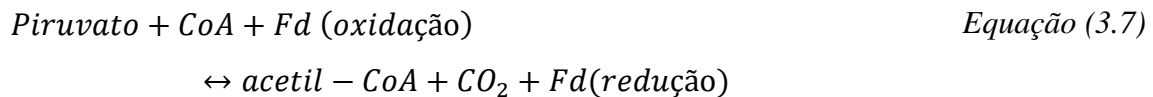
Na produção de hidrogênio utilizando glicose como substrato, em ambiente anóxico, na rota metabólica os prótons podem atuar como aceptores de elétrons na presença da hidrogenasse, que é a enzima chave na catálise do processo de produção de hidrogênio. Sob estas condições, as bactérias utilizam como fonte de energia substratos ricos em carboidratos. Neste processo, os micro-organismos interagem convertendo a matéria orgânica em outros compostos, incluindo o hidrogênio, e biomassa celular bacteriana. O processo está dividido em vários estádios envolvendo diferentes grupos microbianos, cada um com diferente comportamento fisiológico (DE GIOANNIS *et al.*, 2013; SAADY, 2013).

A formação de hidrogênio se inicia com a hidrólise de material particulado complexo em material dissolvido mais simples, tal como a glicose, por ação de bactérias fermentativas hidrolíticas. Neste ponto ocorre uma série de reações enzimáticas onde, a glicose é convertida através da via metabólica da glicólise, também conhecido como via de Embden-Meyerhof-Parnas, a ácido pirúvico (*Equação (3.5)*), através do qual é obtida duas moles de hidrogênio durante a regeneração do NADH (*Equação (3.6)*) (NTAIKOU *et al.* 2010).



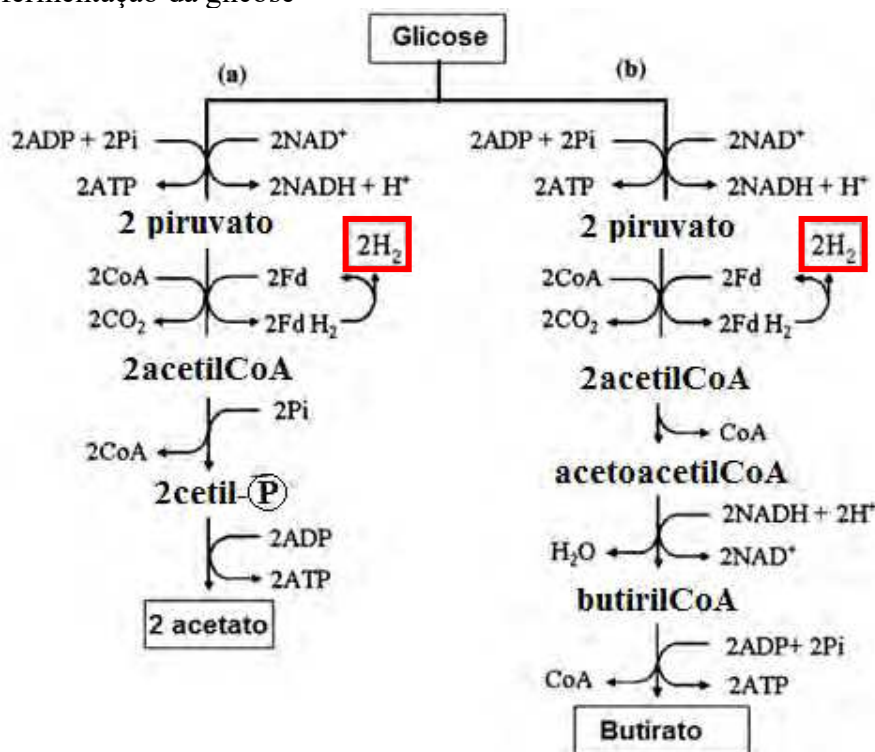
O ácido pirúvico é submetido a um processo de descarboxilação oxidativa pela coenzima acetil-CoA que, depende dos tipos de enzimas que possuem os micro-organismos. Assim, esses metabolitos serão metabolizados em acetato, butirato ou formiato, onde são gerados entre dois a quatro moles de H₂ por mol de glicose

consumida. Desta forma, a acetil-CoA pode ser gerada por meio das reações da Equação (3.7 e Equação (3.8 (HALLENBECK, 2005). Outra forma de gerar acetil-CoA é como se apresenta na reação da Equação (3.8, o que leva à formação de formiato. Esta reação é catalisada pela enzima piruvato-formato liase, onde dois moles de H₂ são obtidos por mole de glicose consumido (HALLENBECK *et al.*, 2012).



A reação da Equação (3.8 é catalisada pela enzima piruvato: ferredoxina oxidoredutase (PFOR) onde a ferredoxina é a coenzima que atua como aceptor de elétrons. Assim também, a acetil-CoA-redutase pode ser metabolizada em acetato (Figura 3.3A) ou butirato (Figura 3.3B) e em ambos os casos, a reoxidação de cada mol de ferredoxina gera uma mol de H₂ através da enzima hidrogenase (KIM *et al.*, 2009).

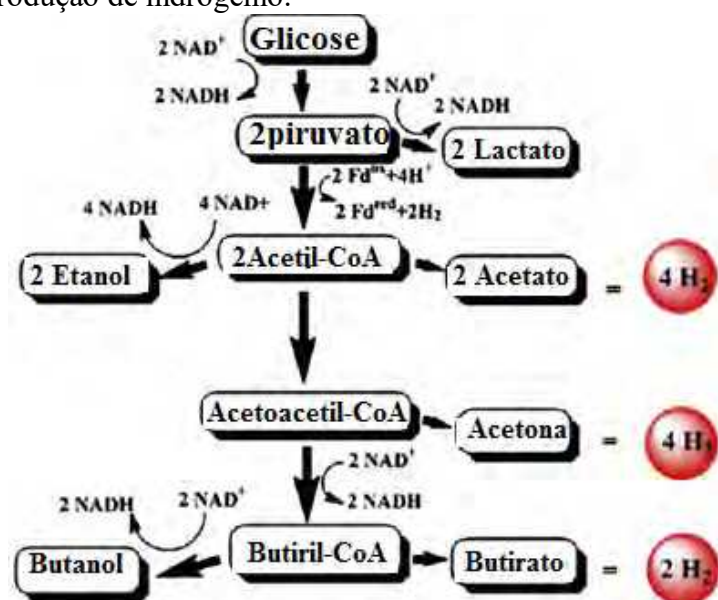
Figura 3.3. Produção de hidrogênio e subprodutos: (A) acetato e (B) butirato a partir da fermentação da glicose



Fonte: Adaptado de NTAIKOU *et al.* (2010)

O acetato, enquanto produto final da fermentação gera um mol de H_2 proveniente da redução do $NADH$ a NAD^+ gerando deste modo 4 mols de H_2 por mol de glicose consumida. Entretanto, se o butirato for o produto final da fermentação, o $NADH$ será utilizado na oxidação do acetil-CoA para butirato, produzindo assim, 2 mols de H_2 por mol de glicose consumida. Dependendo das condições da cultura microbiana e o tipo de micro-organismos, pode simultaneamente gerar o acetato e o butirato, com 4 e 2 mols de hidrogênio (Figura 3.4), respectivamente. (HALLENBECK; GHOSH, 2012; MATHEWS; WANG, 2009; NTAIKOU *et al.* 2010; OH *et al.*, 2011)

Figura 3.4. Produção simultânea do acetato e do butirato através da rota metabólica da glicólise com produção de hidrogênio.



Fonte: Adaptado de MATHEWS; WANG (2009)

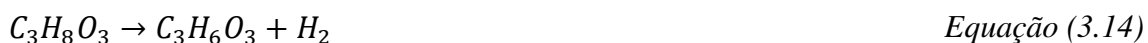
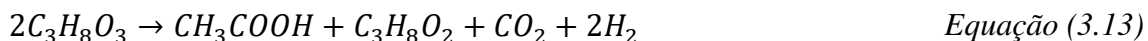
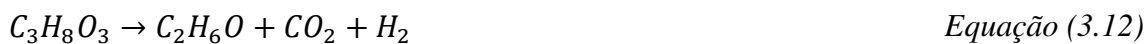
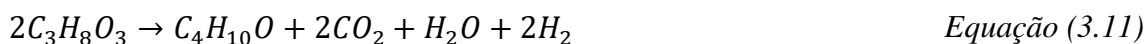
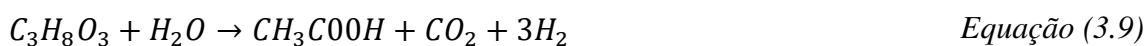
3.10 Rota metabólica do glicerol

O metabolismo fermentativo do glicerol tem sido estudado com grande detalhe e envolve a participação de várias bactérias, tais como a *Citrobacter*, a *Klebsiella*, as *Enterobacterias* e a *Clostridium*. A assimilação de glicerol por estes micro-organismos é estritamente ligada à sua capacidade de sintetizar 1,3-propanodiol (1,3-PDO) e os ácidos orgânicos. O conteúdo de energia do glicerol puro é de 19,0 MJ kg^{-1} , no entanto, para o glicerol bruto é de 25,30 MJ kg^{-1} , possivelmente devido à presença de metanol e biodiesel. Este conteúdo de alta energia do glicerol bruto indica o seu potencial para fornecer carbono na produção do bio-hidrogênio, 1,3-PDO, etanol,

ácido acético, succínico e butírico, principalmente (SARMA *et al.*, 2012; VARRONE *et al.*, 2012).

O processo de fermentação escura a partir de glicerol bruto pode ser realizado junto com a fotofermentação, uma vez que as bactérias fototróficas crescem na presença de ácido orgânicos (os possíveis metabolitos de fermentação escura), produzindo mais hidrogênio. Somado ao processo de fermentação escura, os ácidos orgânicos podem ser utilizados como substratos na produção de gás metano por bactérias acetogênicas e metanogênicas. Os ácido orgânicos produzidos a partir da fermentação escura são metabolizados em acetato e em seguida a metano (CARRILLO-REYES; BUITRÓN, 2016; SINHA; PANDEY, 2011).

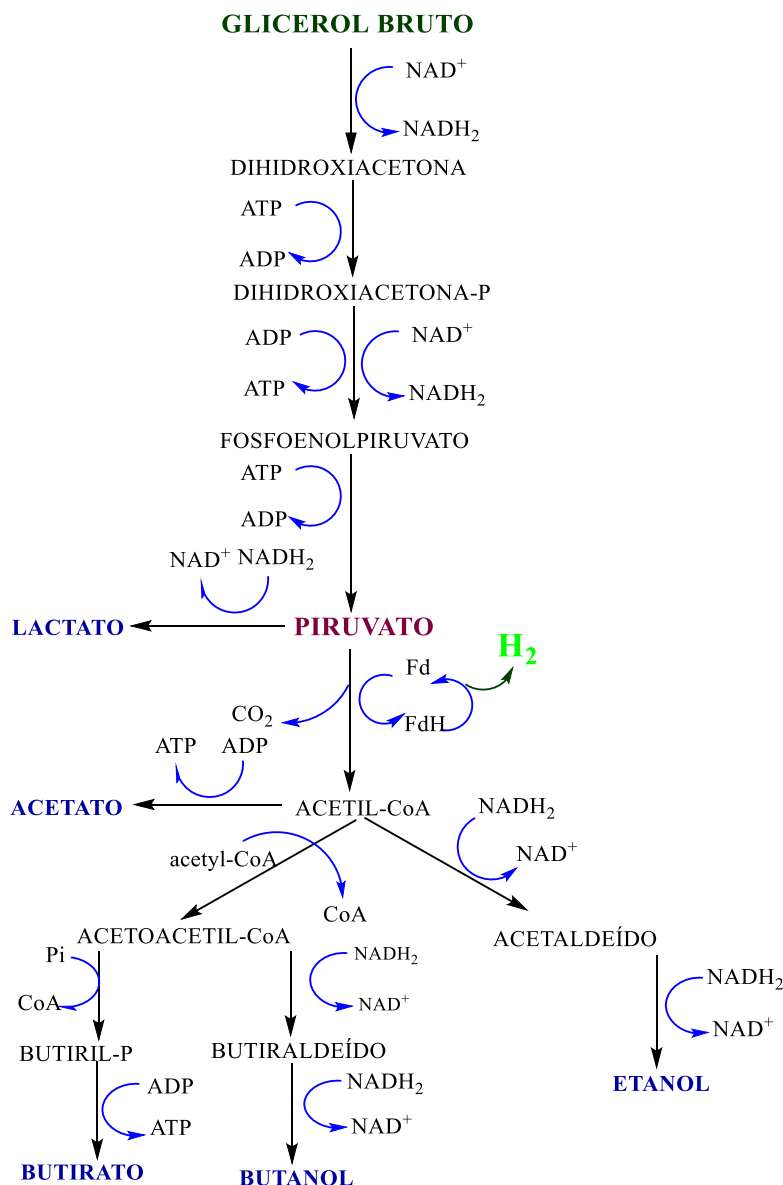
O glicerol bruto como substrato pode ter diferentes rendimentos de hidrogênio por grama de matéria orgânica. Os produtos finais do processo de fermentação podem ser o ácido acético (Equação (3.9), ácido butírico (Equação (3.10), butanol (Equação (3.11) e etanol (Equação (3.12). Além disso, como referido por vários autores, pode também gerar 1,3-PDO (Equação (3.13) acompanhado por maiores rendimentos de H₂, como na fermentação de açúcares. O glicerol, também pode produzir lactato (Equação (3.14) e succinato (Equação (3.15) (DROZDZYŃSKA *et al.* 2011; LIU *et al.*, 2013; MAINTINGUER *et al.*, 2008).



A produção de H₂ e outros metabolitos (etanol, butanol, acetona, acetato, butirato e lactato) competem com a produção de 1,3-propanodiol de forma oxidativa. O

piruvato formado durante a conversão de glicerol (via oxidativa) pode ser utilizado de várias formas por micro-organismos. Por exemplo, o piruvato é responsável pela formação de inúmeros metabólitos, tais como: o lactato, etanol, acetona, butanol e butirato, como demonstrado no metabolismo da glicose (Figura 3.5). Um metabolismo semelhante utilizando glicerol produz em primeiro plano o piruvato, antes da conversão de outros diferentes metabólitos e hidrogênio (WILLKE; VORLOP, 2008; ZHU *et al.* 2002).

Figura 3.5. Produção de hidrogênio e ácido orgânicos a partir de glicerol.



Fonte: Modificado de DROZDYŃSKA *et al.* (2011)

Do ponto de vista da produção de hidrogênio, é interessante relatar que na via de produção de acetato e butirato tem maior rendimento de hidrogênio, que durante a produção de 1,3-PDO. Pois na presença deste composto, os micro-organismos apresentam um baixo rendimento molar de 0,51 a 0,65 ou 0,54 a 0,64 a partir do glicerol, quando adicionado na concentração de 20 g L⁻¹ e 70 g L⁻¹ de glicerol ao meio de cultura, respectivamente (ZHANG *et al.*, 2007).

3.11 Micro-organismos produtores de bio-hidrogênio

Uma ampla gama de fontes microbianas tem sido utilizadas como inóculo na produção de hidrogênio, incluindo o esgoto de estação de tratamento de águas residuais, dejetos bovinos, lamas de esgoto, entre outros (WANG *et al.*, 2011b). Em ambientes anaeróbicos, vários tipos de bactérias acidogênicas são os principais micro-organismos formadores de esporos. Esta vantagem tem sido utilizada por vários autores para eliminar os micro-organismos metanogênicos (consumidores do hidrogênio), não formadores de esporos, por meio de tratamentos: térmico, tipicamente a 105°C durante um período de 15 a 120 minutos, com pH ácido (1 a 2 unidades) e básico (9 a 10 unidades) durante 24 horas. Estes tratamentos selecionam simultaneamente as bactérias acidogênicas formadoras de esporos, produtoras de H₂ quando as condições são favoráveis. A transição dos esporos inativos para vegetativos pode ser dividido em três fases: a ativação, germinação e o crescimento (WANG *et al.*, 2011b; WONG *et al.* 2014).

Dentre os micro-organismos mais eficientes na produção de hidrogênio encontram-se aqueles que pertencem às espécies *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* e aos gêneros *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp. (GHIMIRE *et al.*, 2015a). As *Enterobacter* são anaeróbios facultativos, Gram-negativos, em forma de bastão. As espécies do gênero *Clostridium* são Gram-positivas, anaeróbias estritas formadoras de esporos e, têm forma de bastonetes. Cabe ressaltar que a maioria dos estudos relacionados à produção de bio-hidrogênio tem sido realizado empregando cepas puras utilizando carboidratos como substrato em reatores descontínuos (LUO *et al.*, 2011; MONLAU *et al.*, 2013).

O uso associado de micro-organismos anaeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos na produção de hidrogênio tem sido benéfico, pois os micro-organismos facultativos permitem que o oxigênio seja reduzido a água, criando um ambiente

anaeróbico favorável para o crescimento dos anaeróbicos obrigatórios (DROZDYŃSKA *et al.* 2011). Este fato tem sido relevante, pois desta forma, o uso de agentes redutores no meio de crescimento pode ser evitado reduzindo os custos (WEILAND, 2010). Yokoi *et al.* (1998) usaram um consórcio de *Enterobacter sp.* e *Clostridium sp.* para produzir hidrogênio sob um meio de cultura livre de agentes redutores e, assim, reduziram os custos de produção de hidrogênio. Bactérias capazes de produzir hidrogênio são amplamente encontradas em diferentes ambientes, como solo e esgoto residual, principalmente no lodo anaeróbio utilizado em processos metanogênicos, o que representa um bom exemplo de culturas mistas. A cultura mista de bactérias desses ambientes pode ser usada como inóculo para processos de produção de hidrogênio por fermentação (WONG *et al.* 2014). No entanto, algumas se apresentam como organismos produtores de hidrogênio e outros, como consumidores de hidrogênio, como é o caso dos metanogênicos. Neste sentido, um tratamento adicional antes de seu uso pode ser necessário para suprimir a atividade de bactérias consumidoras de hidrogênio e, assim, favorecer a atividade de bactérias produtoras de hidrogênio (GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2006).

Os benefícios do tratamento térmico e a prevalência da *Clostridium*, abordados nesta pesquisa, torna-se um tema controverso. Pois o inóculo enriquecido com tratamento térmico consome energia. No entanto, a energia necessária para este processo pode ser economizada utilizando o excesso de calor num processo de acoplamento, o qual resulta em um menor consumo de energia, se o processo de fermentação for conduzido a temperaturas mais baixas; isto é, em temperatura mesófila entre 20 a 35°C (GHIMIRE *et al.*, 2016).

3.12 Digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia é um processo fermentativo desenvolvido na ausência de oxigênio, onde a matéria orgânica biodegradável decompõe-se por bactérias desde suas formas mais complexas (hidratos de carbono, proteínas, lipídios), a formas mais simples, incluindo uma mistura de gases conhecidos como biogás. O biogás é composto principalmente de metano (50-70%) e gás carbônico (30-50%), o metano tem um teor de energia que pode ser usado para produzir energia elétrica e calor. A digestão anaeróbia tem sido aplicada a uma ampla gama de materiais orgânicos, incluindo resíduos sólidos urbanos, agroindustriais, coprodutos da cadeia de produção de

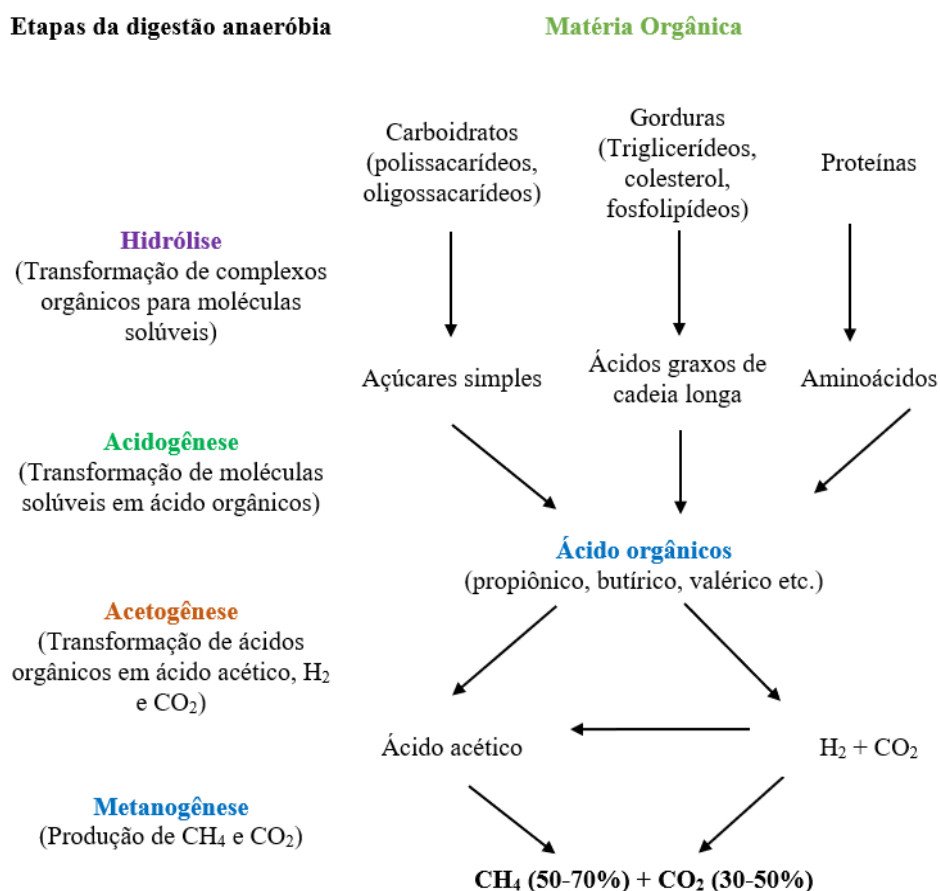
biocombustíveis, entre outros, com a vantagem de ser tratados com baixo requisito de energia na operação (KHALID *et al.*, 2011; MAO *et al.*, 2015; WARD *et al.*, 2008; WEILAND, 2010).

A codigestão anaeróbia é um método de tratamento usado para melhorar o desempenho da digestão anaeróbia pelos seus inúmeros benefícios. Por exemplo, a diluição de componentes tóxicos, aumento da carga de matéria orgânica biodegradável, melhora o equilíbrio de nutrientes e a sinergia entre os micro-organismos. Além da estabilidade e desempenho na produção metano (DENNEHY *et al.*, 2016; KHALID *et al.*, 2011).

3.12.1 Rota metabólica da produção de biometano

A digestão anaeróbia é um processo complexo, onde os micro-organismos realizam uma série de reações bioquímicas. Estudos têm demonstrado que o processo consiste em quatro etapas (hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese), como ilustrado na Figura 3.6. Na primeira etapa ocorre a hidrólise de carboidratos, proteínas e lipídios por enzimas produzidas por micro-organismos. Como resultado, os açúcares, os aminoácidos e os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) são obtidos, essas moléculas simples são consumidas por bactérias acidogênicas e como resultado os ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como álcoois de cadeia curta, ácidos orgânicos como o ácido butírico, ácido propiônico, ácido láctico, ácido valérico. Imediatamente após este processo, os ácidos graxos de cadeia curta são transformados em ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono por bactérias acetogênicas. Tais como ilustrados na Figura 3.6, os produtos da etapa acetogênica são consumidos pelas bactérias metanogênicas gerando biogás (metano), dentre estes, principalmente metano (50-70%, CH₄) e dióxido de carbono (30-50%, CO₂) (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014; MAO *et al.*, 2015).

Figura 3.6. Rota metabólica da produção de biometano a partir de matéria orgânica complexa.



Fonte: Modificado de KONDUSAMY; KALAMDHAD (2014); MAO *et al.* (2015).

3.12.2 Hidrólise

A hidrólise é o estágio inicial da decomposição biológica de carboidratos, proteínas e lipídios, que serão fracionados em unidades menores, como açúcares, aminoácidos, álcoois e ácidos graxos de cadeia longa (FERNÁNDEZ, 2008; MIRON *et al.*, 2000). Esse processo é necessário para iniciar a digestão dos resíduos orgânicos, uma vez que as bactérias em geral não são capazes de assimilar a matéria orgânica particulada devido à sua complexidade (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008). Às vezes é necessário um pré-tratamento, tanto mecânico, térmico, químico ou biológico para alcançar a degradação do substrato orgânico complexo, isto é, com a finalidade de ter menor tempo de retenção, curto nesta fase (FATIH DEMIRBAS *et al.* 2011; LÓPEZ *et al.* 2008).

A hidrólise dos carboidratos ocorre em poucas horas, as proteínas e os lipídios são hidrolisados em poucos dias, mas a lignocelulose e a lignina são degradadas lentamente e não cem por cento (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008). A matéria orgânica é catalisada por enzimas extracelulares produzidas por micro-organismos hidrolíticos. As proteínas são hidrolisadas em aminoácidos por enzimas chamadas proteases, os lipídios a ácidos graxos de cadeia longa e o glicerol pela ação de enzimas chamadas lipases, todos esses produtos de hidrólise são fermentados no estágio acidogênico (WEILAND, 2010).

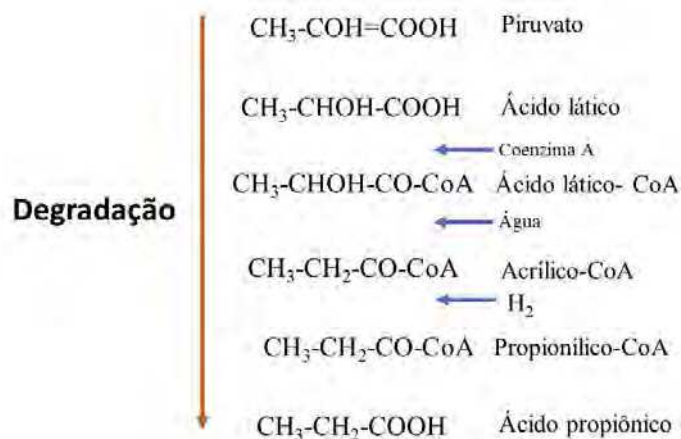
Uma limitação no estágio de hidrólise é a degradação de materiais lignocelulósicos, como lignina, celulose e hemicelulose, já que o processo é tão lento que normalmente é o estágio limitante do processo. Isso porque a lignina é muito resistente à degradação por micro-organismos anaeróbios, afetando também a biodegradabilidade da celulose, hemicelulose e outros carboidratos. Os principais produtos da hidrólise da celulose são celobiose e glicose, enquanto a hemicelulose produz pentose e hexose (OSTREM, 2004).

3.12.3 Acidogênese

Os monômeros da fase hidrolítica são metabolizados no interior da célula, seguindo diferentes rotas metabólicas de acordo com sua natureza, formando assim os ácidos orgânicos de cadeia curta (moléculas C1-C5), ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido lático e cetonas (etanol, metanol, glicerol, entre outros) e pequenas quantidades de hidrogênio e dióxido de carbono, amônio, bem como novas células bacterianas (OSTREM, 2004). Durante este estágio, o valor do pH passará de 7 para valores aproximados a 5 unidades de forma simultânea, devido à formação dos ácidos de cadeia curta (DANIELS *et al.* 1984).

Na fermentação dos carboidratos, a glicose é transformada pela via glicolítica Embden-Meyerhof e Parnas, pela ação de enzimas que catalisam a glicose e se transformam em duas moléculas de piruvato e com produção de duas moléculas de ATP. Posteriormente, o ácido pirúvico é dividido em ácido lático pela ação da acetil-CoA para obter ácido propiônico como produto final, como se apresenta na Figura 3.7, de modo que a produção de ácido propiônico é realizada pelas bactérias propiônicas (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008; OSTREM, 2004).

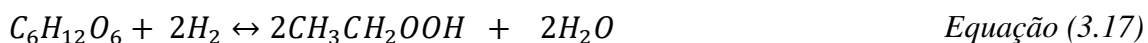
Figura 3.7. Degradação do piruvato à ácido propiônico



Fonte: Adaptado de DEUBLEIN E STEINHAUSER (2008).

Os aminoácidos são degradados pela reação de *Stickland* pela ação das bactérias *Clostridium botulinum*, envolvendo a oxidação-redução de aminoácidos a ácido orgânicos, onde são liberados principalmente o acetato, o dióxido de carbono e o amônio. Os ácidos graxos de cadeia longa são oxidados em ácidos graxos de cadeia curta a partir de bactérias do gênero *Acetobacter*, pelo mecanismo de β -oxidação (OSTREM, 2004), onde os ácidos graxos são ligados com a coenzima A e, em seguida, oxidados em etapas e em cada estágio são separados dois átomos de carbono e liberados como acetato (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008). Algumas vias metabólicas só são possíveis com baixas pressões de H₂, com preferência pela formação de ácido acético. No entanto, elevadas pressões de H₂ podem levar à formação de ácido propiônico e ácido butírico, e a mesma pressão excessiva de hidrogênio pode causar inibição do sistema (MARTÍ, 2005).

As reações geradoras de ácido são mostradas nas seguintes reações. Na Equação 3.16 a glicose é convertida em etanol e, na Equação (3.17, a glicose é transformada em ácido propiônico (RITTMAN, 2001).



3.12.4 Acetogênese

Neste estágio, os organismos favorecem um ambiente ácido, que é conhecido como um estágio acetogênico, onde as bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na acidogênese, em substratos adequados para as bactérias metanogênicas (VIGUERAS, 2002). As bactérias envolvidas neste estágio são anaeróbias obrigatórias ou facultativas, muito abundantes na natureza e que envolvem bactérias dos gêneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Micrococcus* (MADIGAN *et al.*, 1998).

Durante a fermentação de carboidratos, um dos principais produtos é a formação de acetato, dióxido de carbono e hidrogênio. Também, os ácidos graxos são oxidados em ácido acético, ácido propiônico e hidrogênio. Enquanto alguns produtos (acetato e hidrogênio) da fermentação podem ser metabolizados por micro-organismos metanogênicos. No entanto, os ácidos orgânicos e os álcoois precisam ser transformados em produtos mais simples para o acetato e o hidrogênio, e às vezes dióxido de carbono (MARTÍ, 2005).

Do ponto de vista termodinâmico, as reações acetogênicas não são possíveis em condições de pressão e temperatura ($T=25^{\circ}\text{C}$ e $P = 1 \text{ atm}$), porque são reações endergônicas. Por exemplo, a degradação do etanol precisa do $\Delta G' = +76,1 \text{ KJ mol}^{-1}$ e o ácido propiônico do $\Delta G' = +9,6 \text{ KJ mol}^{-1}$ (Tabela 3.2).

Tabela 3.2, Reações acetogênicas no processo de digestão anaeróbica.

Substratos	Reações	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)
Etanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$	+ 76.1
Ácido propiônico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2 + \text{CO}_2$	+ 9.60
H ₂ e CO ₂	$4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	

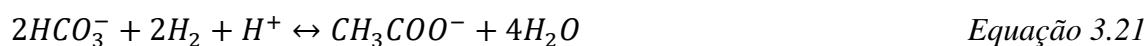
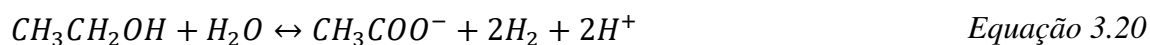
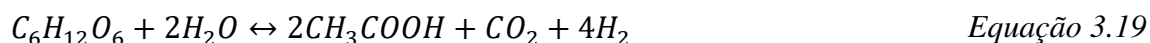
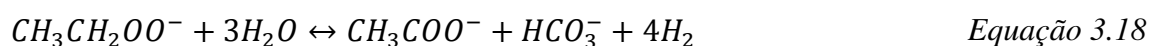
Fonte: Adaptado de DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008

Os micro-organismos homoacetogênicos reduzem o hidrogênio e o dióxido de carbono por meio de reações exergônicas ao ácido acético. Ao contrário das bactérias acetogênicas, como mostrado na Tabela 3.2, as bactérias acetogênicas não produzem hidrogênio como resultado do seu metabolismo, mas são consumidas como substrato, isso é favorável para as bactérias acetogênicas, já que sua sobrevivência e crescimento

podem fazê-lo a baixa pressão parcial do hidrogênio, obtendo o acetato como seu principal produto (MARTÍ, 2005; DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008).

Quando ocorre uma elevada pressão de hidrogênio, a rota metabólica é voltada principalmente para formação de ácido butírico, propiônico, valérico e etanol, os quais são degradados em acetato e hidrogênio, uma vez que são necessários para o crescimento das bactérias acetogênicas. Portanto, o estágio acidogênico limita a taxa de degradação dos substratos para o estágio final (estágio metanogênico), na composição e a quantidade do biogás produzido (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008).

A presença de bactérias que consomem o hidrogênio é necessária para garantir a viabilidade termodinâmica e a conversão dos ácidos orgânicos. Assim, a concentração de hidrogênio, medida pela pressão parcial, é um indicador da saúde de um digestor, nas seguintes reações a produção de acetato e hidrogênio é observada principalmente (Equação 3.18-Equação 3.21) (OSTREM, 2004).



3.12.5 Metanogênese

A metanogênese, último estágio da produção de metano, é considerada uma das mais importantes no consórcio de micro-organismos que a compõem. Esta fase é responsável pela formação do metano e ocorre em condições anaeróbicas rigorosas (DE JUANA, 2004). As bactérias metanogênicas podem ser classificadas principalmente em dois grandes grupos, dependendo do substrato que metabolizam; i) Hidrogenotróficas: são micro-organismos que se desenvolvem autotróficamente usando hidrogênio como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono. A oxidação do hidrogênio reduz o dióxido de carbono para o metano, que é liberado como gás (Tabela 3.3). ii) Acetoclastos: são micro-organismos que consomem o acetato, metanol e algumas aminas. Tem se demonstrado que aproximadamente 70% do metano produzido

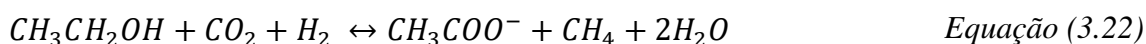
na digestão anaeróbica vem da degradação do acetato (Tabela 3.3) (JIMÉNEZ, 1999, MARTÍ, 2005, DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008).

Tabela 3.3. Reações da produção de metano por vários substratos na digestão anaeróbia.

Substratos	Reações	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)
Hidrogênio	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.4
Acetato	$CH_3COO^- + H_2O \longrightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-30.90
Metanol	$4CH_3OH \longrightarrow 3CH_4 + H^+ + HCO_3^- + H_2O$	-314.3

Fonte: Adaptado de DEUBLEIN E STEINHAUSER (2008).

Dois terços dessa etapa são derivados da conversão do acetato (Equação (3.22) e Equação (3.23)) ou da fermentação do álcool metílico (Equação (3.24)) e o outro terço é o resultado da redução de CO₂ e H₂ (Equação (3.25)) (OSTREM, 2004):



Algumas bactérias identificadas como metanogênicas são *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanogenium* e *Methanomicrobium* (YU *et al.*, 2008).

3.13 Inibição do processo anaeróbico

O processo de inibição anaeróbica pode ser ocasionado por alguns compostos químicos em determinadas concentrações e causam disfunção no processo, interrompendo completamente o crescimento dos micro-organismos, fato que reflete no decaimento da produção de metano. Os compostos químicos que comumente inibem a

digestão anaeróbica são: a amônia, o enxofre, os metais e alguns compostos orgânicos (OSTREM, 2004; PALATSI *et al.*, 2011) conforme descrito a seguir.

3.13.1 Inibição por amônia

Existem fatores importantes que afetam a inibição pela amônia, o primeiro é o pH que afeta a proporção de amônia livre e o íon amônio na digestão anaeróbica. Embora o nitrogênio amoniacal total possa permanecer constante; o pH alto resulta em uma maior liberação de amônia livre, enquanto o pH baixo está associado com o aumento do íon amônio. O segundo fator de inibição pela amônia é a aclimação de bactérias metanogênicas a uma combinação de amônia estabelecida (YENIGÜN; DEMIREL, 2013).

A amônia é um produto da digestão anaeróbia, que é gerada pela biodegradação de proteínas e ureia. O íon amônia (NH_4^+) e a amônia livre são as principais formas de nitrogênio inorgânico na digestão anaeróbica. As bactérias metanogênicas são muito mais sensíveis à inibição do amônio do que as bactérias hidrolíticas, acidogênicas e acetogênicas em uma concentração de 4,0-5,7 g L⁻¹ de nitrogênio amoniacal total, uma concentração inferior a 200 mg L⁻¹ favorece o crescimento de bactérias (WANG *et al.*, 2014b; YENIGÜN; DEMIREL, 2013).

3.13.2 Inibição por metais

Geralmente, no tratamento de esgoto urbano por digestão anaeróbia as bactérias são mais suscetíveis de serem inibidas, já que em ocasiões têm sido observadas elevadas concentrações de sais, que causam uma desidratação das células microbianas pela pressão osmótica, os cátions são geralmente responsáveis por essa inibição. Os cátions de sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca_2^+) e magnésio (Mg_2^+) são comumente encontrados. Também, no efluente são encontrados os metais pesados como ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), níquel (Ni), manganês (Mn), cromo (Cr), cádmio (Cd) e paládio (Pb). A maioria desses metais são nutrientes necessários para o crescimento de bactérias anaeróbias, mas em concentrações elevadas podem ser tóxicos para as bactérias (CHEN *et al.* 2008; YENIGÜN; DEMIREL, 2013).

3.13.3 Inibição por compostos orgânicos

Alguns compostos orgânicos apresentam inibição ou toxicidade à digestão anaeróbica, o que inclui alcanos, álcoois, aldeídos, éteres, cetonas e ácidos carboxílicos, incluindo ácidos graxos de cadeia longa, bem como benzenos, fenóis, aromáticos halogenados, nitro-aromáticos, aminas e derivados (DEUBLEIN E STEINHAUSER, 2008 CHENG, 2010).

O acúmulo de substâncias poluentes apolares nas membranas bacterianas faz com que a membrana inche gerando infiltrações e ainda, interrompendo os gradientes iônicos, que eventualmente acabam em lise celular (OSTREM, 2004). Por outro lado, alguns resíduos principalmente da agricultura contêm uma quantidade significativa de lignina, que tem uma estrutura complexa que inclui compostos fenólicos aromáticos e apresentam inibição em bactérias anaeróbias. Também, os derivados da lignina com grupos aldeídos ou substituintes apolares são altamente tóxicos e os ácidos carboxílicos aromáticos que são levemente tóxicos (CHENG, 2010).

3.14 Parâmetros operacionais

3.14.1 Pressão parcial do hidrogênio

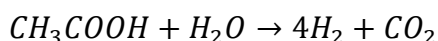
Diversos estudos têm mostrado que a pressão parcial do hidrogênio desempenha um papel fundamental nos processos biológicos de produção do hidrogênio, que é limitado pela termodinâmica da reação das enzimas hidrogenasse, uma vez que a transferência de elétrons de uma molécula intracelular transporta elétrons para os prótons.

Durante o processo anaeróbio, os prótons são pobres aceptores de elétrons, devido ao seu potencial de redução de oxidação ($H_2 = -14$ mV), o doador de elétrons deve ser um forte agente redutor. Por exemplo, a ferridoxina é uma proteína de sulfuroferro de baixo potencial redox (-400mV), capaz de reduzir os prótons ao hidrogênio. Outro portador de elétrons intracelular é o NADH, uma vez que possui um potencial redox de -320mV. A capacidade de redução da ferridoxina e do NADH para reduzir os prótons é determinada pelo potencial redox da reação líquida em condições reais. Assim, se assumir-se que as concentrações intracelulares são as mesmas, tanto para as formas oxidadas como reduzidas do ferredoxina e do NADH, a produção de hidrogênio torna-se termodinamicamente desfavorável quando ocorre um aumento na

pressão parcial de hidrogênio (ARIMI *et al.*, 2015; BUNDHOO; MOHEE, 2016; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2006).

A produção de hidrogênio na presença de ferridoxina é contínua quando a pressão parcial de hidrogênio é menor que 0,3 atm; para o NADH, a pressão parcial de hidrogênio deve ser menor que $5,9 \times 10^{-4}$ atm. No entanto, elevadas pressões parciais de hidrogênio podem ser alcançadas, se a proporção de ferredoxina reduzida para ferredoxina oxidada for maior que um. Desta forma, não é inesperado encontrar concentrações de mais de 30% de hidrogênio no espaço livre do reator. (BUNDHOO *et al.* 2015; OH *et al.* 2011).

A oxidação de componentes complexos reduzidos de ácidos graxos de cadeia longa para ácidos orgânicos (Ácidos orgânicos); juntamente com a produção de hidrogênio são desfavoráveis porque são termodinamicamente desfavoráveis (DONG *et al.*, 2009). A formação de hidrogênio pode ser derivada da degradação do acetato, de acordo com a Equação 3.26.



Equação 3.26

Esta reação é desfavorável a temperaturas moderadas e a reação será extremamente sensível à concentração de hidrogênio. Além disso, a reação inversa, chamada homoacetogênese, é bastante favorecida no processo de fermentação e o rendimento de hidrogênio no reator é reduzido através do acúmulo de acetato. Quando aumenta a concentração de hidrogênio, não somente a produção pode ser afetada, mas também uma mudança na via metabólica, isto é, para a via da solvogênese; com acúmulo de lactato, etanol, acetona e butanol (GHIMIRE *et al.* 2015; J. YU AND TAKAHASHI 2007).

O metabolismo do ácido propiônico é muito sensível à pressão parcial de hidrogênio, que deve ser menor que 9×10^{-5} atm para permitir sua degradação. Deste modo, é claro que quando o hidrogênio se acumula, o ácido propiônico é gerado rapidamente e o processo de degradação torna-se mais lento (KARLSSON and VALLIN, 2008).

O principal fator que leva à solvogênese é o acúmulo de ácidos orgânicos, em vez da pressão parcial de hidrogênio. Por isso é importante manter baixa pressão de hidrogênio no reator. Para isso, alguns autores sugerem uma constante agitação ou injeção de gás inerte para remover o hidrogênio, principalmente o nitrogênio. Neste

caso, sugere-se adicionar o gás intermitentemente, a fim de deslocar a maior quantidade de hidrogênio do meio (JUNG *et al.* 2011; ŁUKAJTIS *et al.*, 2018).

3.14.2 Temperatura

A temperatura é um parâmetro de elevada influência, uma vez que as taxas de reação dos processos biológicos dependem da taxa de crescimento dos micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbica, os quais, por sua vez, dependem da temperatura. À medida que a temperatura aumenta, a taxa de crescimento dos microrganismos aumenta e o processo de digestão acelera, levando a uma maior produção de metano ou hidrogênio (KOTSYURBENKO, 2005; MAO *et al.*, 2015)

No processo de digestão anaeróbica tem diferentes faixas de temperatura de 20-40°C para bactérias mesofílicas e entre 45 a 60°C para os micro-organismos termofílicos. Em geral, a digestão anaeróbia é realizada em condições mesófilas de temperatura mantendo estabilidade e com menor gasto energético (KHALID *et al.*, 2011; KRAKAT *et al.*, 2010). KRAUSE *et al.* (2017) verificaram que a temperatura de 35°C é a temperatura de operação ótima para um período de 18 dias de digestão anaeróbica, enquanto uma pequena variação de temperatura de 35°C a 30°C causa redução na taxa de produção biogás. Uma gama de temperatura de 35°C a 37°C é considerada adequada para a produção de metano, mas uma mudança de temperatura pode causar um decréscimo acentuado na produção de biogás (KANCHANASUTA; SILLAPARASSAMEE, 2017; SILES *et al.*, 2010).

3.14.3 pH

Um indicador de funcionamento dos digestores anaeróbios na produção de biogás ou hidrogênio é o pH, o qual muda em resposta às conversões biológicas durante o processo de digestão anaeróbica. Um pH estável indica que o sistema está em equilíbrio (CHU *et al.*, 2008). WEILAND (2010) afirmou que a formação de metano ocorre ao longo de um intervalo de pH de 6,5 a 7,5 com um intervalo ótimo de 7 e 8, enquanto a produção de hidrogênio é gerada na faixa de 5,5 a 6,5.

O processo de digestão anaeróbia é drasticamente inibido, se o pH for inferior aos 6 ou superior aos 8,5 na produção de metano. Na produção de hidrogênio,

se o pH estiver acima de 6,5 haverá produção de metano e abaixo de 6,0 ocorrerá acúmulo de ácido orgânicos.

O pH tende a subir quando o acúmulo de amônia no processo de degradação de proteínas aumenta, e tende a diminuir quando há o acúmulo de ácido orgânicos (Ácido orgânicos). WARD *et al.* (2008) demonstrou que no intervalo de pH de 6,8 a 7,2 é ideal para levar a cabo o processo de digestão anaeróbica de forma eficiente. Durante a fase de hidrólise e acidogênese o pH varia entre 5,5- 6,5, pelo acúmulo de Ácido orgânicos, mas não resulta sempre em decréscimo de pH devido à capacidade tampão do substrato ou da mistura dos substratos. Por exemplo, os dejetos de animais têm excesso de alcalinidade que estabiliza o pH durante a acumulação de Ácido orgânicos, sem a capacidade buffer dos substratos a fase metanogênica seria inibida (WANG; WAN, 2009). Outro problema relacionado com a digestão anaeróbia é o pH alcalino (superior aos 8,5), promovido pela baixa relação carbono/nitrogênio (C/N), maior concentração de amônia no meio fermentativo afeta às bactérias metanogênicas. Para melhorar a relação de C/N no processo, é recomendável a mistura de substratos que melhorem o balanço na relação C/N entre 15-40, que mantem equilíbrio no pH do processo anaeróbio (BOUALLAGUI *et al.*, 2009).

3.14.4 Relação carbono/nitrogênio (C/N)

Os processos de digestão anaeróbia precisam de matéria orgânica com elevado conteúdo de carbono e nitrogênio. Pois, os micro-organismos anaeróbios necessitam desses dois elementos para desenvolver a sua atividade e orientar o metabolismo para uma via não assimilativa. Isso significa direcionar o metabolismo para a formação de produtos (metano ou hidrogênio) e não para a formação de biomassa celular (WANG *et al.*, 2014b). Os micro-organismos anaeróbios exigem carbono como fonte de energia e nitrogênio para a formação de estruturas celulares. A relação C/N da matéria orgânica desempenha um papel importante na digestão anaeróbica, devido ao fato de que os micro-organismos anaeróbios a consomem em certa proporção (KHALID *et al.*, 2011). Existem muitos critérios em relação a essa relação, mas uma proporção de 15-30:1 é geralmente reconhecida como aceitável, fornecendo nitrogênio suficiente para melhorar o rendimento no consumo dos substratos e melhorar o desempenho de biogás durante a digestão anaeróbia (BOUALLAGUI *et al.*, 2009).

3.14.5 Planejamento experimental pela metodologia de superfície de resposta (MSR)

A MSR é a combinação da análise de regressão e o planejamento experimental que foi introduzido por Box e Wilson em 1951. Essa ferramenta se constitui em uma estratégia de experimentação sequencial e modelagem que leva à localização dos valores ótimos das variáveis independentes que maximizam, minimizam ou atendem a certas restrições na variável de resposta (JIMÉNEZ-CAREAGA, 2015).

A MSR consiste em um grupo de dados matemáticos e estatísticos, que são técnicas usadas no desenvolvimento da relação funcional adequada entre uma resposta de interesse (y) e um número de controle associado (ou entrada), variáveis denotadas por x_1, x_2, \dots, x_k . Uma superfície de resposta em primeira instância refere-se à localização da região na qual a resposta ótima é encontrada e, nas etapas seguintes, após a verificação experimental, é reduzida a superfície de resposta em estudo, em alguns casos até obter a convergência em um ponto ótimo (DA CONCEIÇÃO *et al.*, 2016; KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

O planejamento experimental é realizado a partir dos valores mínimos e máximo das variáveis independentes a estudar (x). Posteriormente as variáveis de resposta (y) se analisa aplicando um planejamento composto central rotacional com três fatores, seis pontos axiais e quatro pontos centrais, de maneira a possibilitar a descrição dos resultados por meio de um modelo linear, quadrático e de interação (GHOSH 2012; KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

O processo começa com o planejamento de um projeto exploratório experimental, que permite a aproximação à superfície através da representação matemática dos modelos mais simples, dentre estes temos (JIMÉNEZ-CAREAGA, 2015):

O modelo de primeira ordem (linear) sem interações ou produtos cruzados (Equação (3.27):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad \text{Equação (3.27)}$$

Modelo de primeira ordem (lineal) com interações ou produtos cruzados (Equação (3.28):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Equação (3.28)}$$

Onde

y=Resposta

x_i =fatores quantitativos observados

ε = representa o ruído ou erro observado

Nesta primeira fase, são usados os experimentos fatoriais completos de 2^k ou fracionários 2^{k-p} , a fim de estimar as respostas médias para um modelo linear ou de primeira ordem, como observado na equação 28 (BEZERRA *et al.*, 2008, BESZÉDES *et al.*, 2011).

Quando a hipótese de suficiência de ajustamento for rejeitada, o nível do modelo deve ser elevado, aumentando termos e/ou condições entre produtos de maior grau em x_1, x_2, \dots, x_k . Se a hipótese não for rejeitada, podemos inferir que a superfície é plana. Uma vez que a equação tem sido testada e o ajuste foi provado, são procurados níveis para melhorar os valores da resposta (BESZÉDES *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2008).

O modelo de segundo ordem encontra-se a seguir, Equação 3.29:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Equação 3.29}$$

Onde

y=A resposta

x_i, x_j =fatores quantitativos observados

ε = representa o ruído ou erro observado

A análise de variância é usada para identificar os fatores que têm maior influência sobre a resposta e para examinar a adequação do modelo. A direção na qual a região ideal está localizada é determinada pelo método de inclinação máxima. A análise da superfície ajustada é realizada através do análise canônica, o que permite determinar a natureza do ponto estacionário (LÓPEZ-CARMONA *et al.*, 2001). Para isso, o nível de significância dos coeficientes estimados e o ajuste do modelo serão provados com o estatístico p . Depois de verificar que o modelo tem suficiência de ajuste e que os coeficientes são significativos, procede-se a localização das coordenadas do ponto

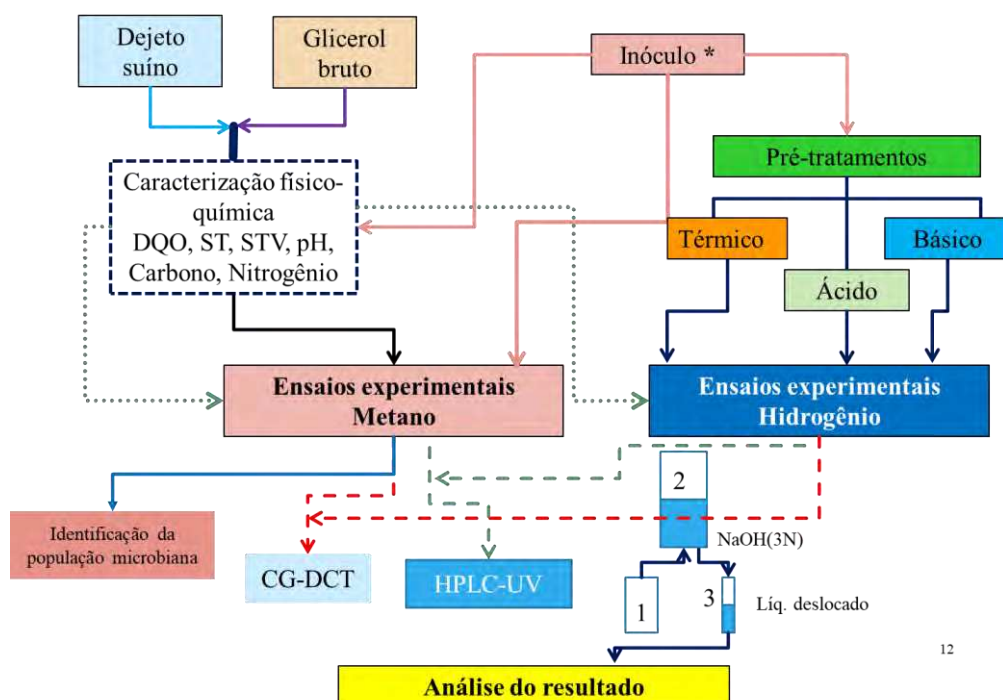
estacionário e analisados, com mais detalhe os resultados do sistema de resposta (GHOSH *et al.* 2012; MARONE *et al.*, 2015).

Neste contexto o presente tem como objetivo avaliar a combinação do glicerol bruto (GB) proveniente da produção de biodiesel e, de dejetos suínos (DS) da suinocultura, para a produção de biogás por codigestão anaeróbica e produção de bio-hidrogênio por fermentação escura. Ambas as tecnologias têm potencial para se aplicar ao tratamento de efluentes gerados na suinocultura e da produção de biodiesel do Brasil. Da mesma forma, podem ainda, gerar informações sobre as melhores condições operacionais dos sistemas de produção de biogás e bio-hidrogênio, através da metodologia de superfície de resposta (MSR), destinada a maximizar a produção de ambos os gases.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas experimentais deste estudo encontram-se resumidas em um diagrama de fluxo da produção de biogás por codigestão anaeróbica e a produção de hidrogênio por fermentação escura, conforme apresentada a seguir. O processo iniciou com a caracterização físico-química do glicerol bruto, dejetos suíno e inóculo, seguido dos ensaios de produção de biogás e hidrogênio e suas respectivas análises (Figura 4.1).

Figura 4.1. Fluxograma das atividades desenvolvidas na etapa de estudo da produção de biogás por digestão anaeróbica e a produção de hidrogênio por fermentação escura.



Fonte: Próprio autor.

4.1 Obtenção dos dejetos suínos (DS), glicerol bruto (GB) e inóculo

Os dejetos suínos foram obtidos frescos e provenientes do departamento de Zootecnia da UFVJM, Diamantina/MG/ Brasil, e da suinocultura do estado de Morelos, México. Os efluentes foram mantidos a -4°C até sua utilização. Os inóculos utilizados foram provenientes do esgoto das estações de tratamento de efluentes das duas localidades já mencionadas. Os reagentes e solventes utilizados neste trabalho apresentavam grau analítico P.A. e os padrões analíticos usados para as análises cromatográficas possuíam grau de pureza mínima >99%. O glicerol bruto utilizado foi proveniente do processo de recuperação após a transesterificação de óleos residuais (óleos de fritura), de girassol, de soja, entre outros, com metóxido de sódio, doados

pelos Laboratórios de Produção de Biodiesel, Biolubrificantes e Biograxas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri-UFVJM, Diamantina/MG/Brasil e pelo Laboratório de Bioenergia do Instituto de Energías Renovables-IER-UNAM, Temixco/Morelos, México.

4.2 Caracterização do glicerol bruto, dejetos suíno e inóculo

O glicerol bruto, o dejetos suíno e o inóculo foram caracterizados quanto as seguintes análises: demanda química de oxigênio (DQO) quantificada pelo método do dicromato de potássio determinado por espectrofotometria com leitura a 600nm; teor de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV) por gravimetria; determinação do teor de amônia por espectrofotometria com leitura a 600nm utilizando kit Powder Pillows – 8155 e pH em pHmetro Fisher Science Benchtop por leitura direta. Todas as determinações analíticas foram propostos pela American Public Health Association (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1995) e realizadas em triplicata. A porcentagem de carbono, nitrogênio e hidrogênio no glicerol bruto e nos dejetos suínos foram determinadas através de análise elementar (Analisador Elementar CHNS/O TruSpec® Micro, LECO, USA).

4.3 Produção de biogás da codigestão anaeróbia da combinação de GB e DS

O processo de produção de biogás foi pelo delineamento composto central rotacional, usando duas variáveis o glicerol bruto (GB) e os dejetos suínos (DS), que foram examinados nas faixas de 4 a 10 g L⁻¹ e 5 a 15 g L⁻¹, respectivamente, de acordo com o item 4.3.1.1, respectivamente. Seguido da avaliação da produção de biogás com aumento na concentração do glicerol bruto (GB) e os dejetos suínos (DS), que foram examinados nas faixas de 6 a 15 g L⁻¹ e 7,5 a 22,5 g L⁻¹, respectivamente, apresentado no item 4.3.2.

4.3.1 Avaliação da produção de biogás

4.3.1.1 Planejamento experimental para a codigestão anaeróbica do GB e dos DS

Os ensaios para o estudo de codigestão anaeróbia (produção de biogás) foram planejados usando delineamento composto central rotacional, conforme apresentado na Tabela 4.1. O planejamento consistiu no uso de dois fatores, quatro pontos axiais e

quatro pontos centrais. Os fatores avaliados foram as concentrações do glicerol bruto (GB) e do dejetos suíno (DS).

Tabela 4.1. Matriz do delineamento composto central utilizada para o estudo da codigestão anaeróbica empregando glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS) como substrato, contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais.

Variáveis	Fatores	Axial (-α)	Mínimo (-1)	Ponto central (0)	Máximo (+1)	Axial (+α)
x_1	GB (g L ⁻¹)	2,75	4,00	7,00	10,00	11,24
x_2	DS (g L ⁻¹)	2,93	5,00	10,00	15,00	17,07

Fonte: Próprio autor.

4.3.1.2 Ensaio para produção de biogás

Os ensaios para produção de biogás realizados a partir da codigestão foram conduzidos de modo descontínuo, utilizando como biorreatores não instrumentados frascos cilíndricos de vidro com capacidade para 50 mL e 100 mL, ambos contendo tampa com septo de silicone. Os biorreatores receberam diferentes quantidades da mistura dos substratos (GB e DS) a fim de atingir as concentrações determinadas no planejamento experimental. Os substratos combinados foram previamente caracterizados quanto a DQO, ST, SV seguindo o desenho experimental, conforme detalhado na Tabela 4.2. Após a adição dos substratos procedeu-se o inóculo com 5 g de SV de inóculo, equivalente a 120 mg de sólidos voláteis por 50 mL.

Tabela 4.2. Ensaios conduzidos para avaliar os efeitos dos substratos, glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS), na codigestão anaeróbica de acordo com o preconizado no delineamento composto central.

Ensaios	Fatores		Ensaios	Fatores	
	GB (g L ⁻¹)	DS (g L ⁻¹)		GB (g L ⁻¹)	DS (g L ⁻¹)
1	4,00	5,00	7	7,00	2,93
2	4,00	15,00	8	7,00	17,07
3	10,00	5,00	9	7,00	10,00
4	10,00	15,00	10	7,00	10,00
5	2,75	10,00	11	7,00	10,00
6	11,24	10,00	12	7,00	10,00

Fonte: Próprio autor.

4.3.2 Aumento da concentração dos substratos na codigestão anaeróbia

4.3.2.1 Planejamento experimental para a codigestão anaeróbica

Os ensaios para o estudo de codigestão anaeróbia (produção de biogás) foi delineado pelo planejamento experimental, usando o delineamento composto central rotacional, conforme apresentado na Tabela 4.3. O planejamento consistiu em dois fatores, quatro pontos axiais e quatro pontos centrais. Os fatores avaliados foram as concentrações do glicerol bruto (GB) e do dejetos suíno (DS).

Tabela 4.3. Matriz do delineamento composto central utilizada para o estudo da codigestão anaeróbica empregando glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS) como substrato, contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais.

Variáveis	Fatores	Axial (-α)	Mínimo (-1)	Ponto central (0)	Máximo (+1)	Axial (+α)
x_1	GB (g L ⁻¹)	4,13	6,00	10.5,00	15,00	16,86
x_2	DS (g L ⁻¹)	2,40	7.5,00	15,00	22,50	25.61

Fonte: Próprio autor.

4.3.2.2 Efeito do aumento do glicerol bruto e dejetos suíno na codigestão anaeróbia

Os ensaios para produção de biogás realizados a partir da codigestão foram conduzidos de modo descontínuo, utilizando frascos cilíndricos de vidro com capacidade para 50 mL e 100 mL, ambos contendo tampa com septo de silicone. Os biorreatores receberam diferentes quantidades da mistura dos substratos (GB e DS) a fim de atingir as concentrações determinadas no planejamento experimental. Os substratos combinados foram previamente caracterizados quanto a DQO, ST, SV seguindo o desenho experimental, conforme detalhado na Tabela 4.3. Após a adição dos substratos procedeu-se o inóculo com 3 mL de inóculo no reator de 250 mL.

Após de testar os ensaios de codigestão anaeróbia da mistura dos resíduos do planejamento da Tabela 4.1, foi aumentada a carga orgânica 50% a mais da concentração dos fatores do item 4.3.1. Os reatores foram inoculados com 3 g de sólidos voláteis. Após a adição do inóculo, os reatores receberam diferentes proporções da mistura dos substratos, GB e DS, de acordo com as concentrações determinadas pelo delineamento dos experimentos, conforme detalhado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Ensaios conduzidos para avaliar o aumento da carga orgânica dos substratos, glicerol bruto (GB) e dejetos suínos (DS), na codigestão anaeróbica.

Ensaio	GB (g L⁻¹)	DS (g L⁻¹)	Ensaio	GB (g L⁻¹)	DS (g L⁻¹)
1	6,00	7,50	7	10,50	4,39
2	6,00	22,50	8	10,50	25,61
3	15,00	7,50	9	10,50	15,00
4	15,00	22,50	10	10,50	15,00
5	3,75	15,00	11	10,50	15,00
6	16,86	15,00	12	10,50	15,00

Fonte: Próprio autor.

4.4 Ensaio de produção de hidrogênio

4.4.1 Produção de hidrogênio a partir da Glicose, glicerol bruto e dejetos suínos pela codigestão anaeróbia

4.4.1.1 Enriquecimento dos inóculos

O inóculo foi dividido em três partes, e cada parte foi avaliada por três diferentes métodos de pré-tratamento, a saber: I) por calor úmido a 105°C, sob 1 atm durante 60 minutos, II) pela adição de soluções ácidas, sendo esta elaborada com ácido sulfúrico a 3 mol L⁻¹, pH 1,0 e III) pela adição de solução básica de hidróxido de sódio 3 mol L⁻¹. Os pré-tratamentos II e III foram mantidos por 24 horas e após este período de reação tiveram o pH ajustado para 6.5.

4.4.1.2 Ensaios para produção de bio-hidrogênio

O processo para a produção de bio-hidrogênio foi conduzido utilizando o delineamento composto central conforme apresentado nas Tabelas 4.5 e 4.6. Os ensaios foram conduzidos de forma contínua utilizando frascos de vidro como biorreator, na co digestão anaeróbia foram realizados utilizando como substratos diferentes combinações de Glicose/GB/DS, concentrações apresentadas na Tabela 4.6. Tais ensaios foram inoculados, previamente submetido a diferentes pré-tratamentos, sendo estes o térmico, ácido e o básico, conforme descritos anteriormente no item 4.4.2. O volume final no biorreator foi ajustado para 25 mL com água destilada e o pH então,

determinado. Os frascos foram fechados para manter um ambiente anaeróbio e em seguida incubados em banho termostático a $30 \pm 1,0^\circ\text{C}$ até o final da fermentação, a qual foi evidenciada pelo término da produção de gás. O processo fermentativo foi monitorado quanto ao volume de hidrogênio por um período de 40 dias, a cada 24h.

Tabela 4.5. Matriz do delineamento composto central utilizada na produção de bio-hidrogênio empregando como substrato a glicose, o glicerol bruto (GB) e o dejetos suíno (DS), contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais

Fatores	Axial	Mínimo	Ponto central	Máximo	Axial
	(-α)	(-1)	(0)	(+)	(+α)
Glicose (g L^{-1})	2,75	4	7	10	11,24
Glicerol Bruto (g L^{-1})	2,75	4	7	10	11,24
Dejetos Suíno (g L^{-1})	2,93	5	10	15	17,07

Fonte: Próprio autor.

Tabela 4.6. Diferentes ensaios empregados para avaliar os efeitos da combinação da glicose, do glicerol bruto (GB) e do dejetos suíno (DS) na fermentação escura conforme delineamento composto central

Ensaio	Glicose (g L^{-1})	GB (g L^{-1})	DS (g L^{-1})	Ensaio	Glicose (g L^{-1})	GB (g L^{-1})	DS (g L^{-1})
1	3,00	4,00	5,00	10	17,485	7,00	10,00
2	3,00	4,00	15,00	11	9,00	2,75	10,00
3	3,00	10,00	5,00	12	9,00	11,24	10,00
4	3,00	10,00	15,00	13	9,00	7,00	2,93
5	15,00	4,00	5,00	14	9,00	7,00	17,07
6	15,00	4,00	15,00	15	9,00	7,00	10,00
7	15,00	10,00	5,00	16	9,00	7,00	10,00
8	15,00	10,00	15,00	17	9,00	7,00	10,00
9	0,514	7,00	10,00	18	9,00	7,00	10,00

Fonte: Próprio autor.

4.4.1.3 Identificação da microbiota contida no inóculo

Considerando que a microbiota presente no biorreator depende da combinação e/ou da concentração da mistura de resíduos (GB/DS), o isolamento e a identificação da taxonomia da microbiota da codigestão anaeróbica se fez necessária. O isolamento e a identificação taxonômica foram realizados no Instituto de Biotecnologia

da Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), conforme descrito a seguir:

4.4.1.3.1 Extração de DNA e sequenciamento de 16S rRNA

As extrações de DNA foram realizadas a partir de 0,5 g do fermentado utilizando o kit (MO BIO-QIAGEN) de acordo com as instruções do fornecedor. O DNA obtido foi visualizado em gel de agarose 1% como descrito por Green and Sambrook (2012). Para a amplificação da região variável dos primers do gene ribossômico de 16s foram utilizados as sequencias 6s_FW (5'->3'): TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG e 16S_RV (5'->3'): GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA e TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C (KLINDWORTH *et al.*, 2013) e foi usada a enzima DNA polimerase NZYTaQ II para amplificar os genes 16S. O protocolo de amplificação consistiu em 30 ciclos a 90°C por 15 minutos. Os amplicons 16Ss rRNA (~ 550 bp) foram visualizados em agarose em gel 1%.

O gen 16S foi sequenciado no equipamento MiSeq (Illumina) em uma configuração de 600 ciclos por pares. O sequenciamento foi preparado de acordo com o protocolo Metagenomic Sequencing Library Preparation protocol de Illumina usando o Flash v1.2.7 (MAGOČ; SALZBERG, 2011) para montar os amplicons de leituras finais emparelhadas. As sequências não foram sobrepostas para as análises.

4.4.1.3.2 Identificação taxonômica com base no rRNA 16S

Os organismos foram classificados em grupos taxonômicos (táxons) com base em suas semelhanças ou relacionamentos. A anotação taxonômica das amplicons reconstruídas com rRNA 16S foram realizadas utilizando Parallel-meta v2.4.1 (ESSID *et al.*, 2003) com recomendação da base de dados v2.1.1 (BENGTSSON-PALME *et al.*, 2015) de acordo com Escobar-Zepeda *et al.* (2018). Foram observadas relativas abundâncias de níveis taxonômicos pela função R v3.4.3. A diversidade alfa (índices de Chao1 e Shannon) foi calculada usando a biblioteca Phyloseq v1.19.1 R. (MCMURDIE; HOLMES, 2013), e a diversidade beta foi estimada pelo índice de Bray-Curtis através da biblioteca Vegan v2.4-6R (OKSANEN *et al.* 2018).

4.4.2 Produção de hidrogênio a partir do GB e DS por fermentação escura

4.4.2.1 Enriquecimento dos inóculos

O inóculo produtor de hidrogênio foi dividido em duas partes, e cada parte foi submetida a dois diferentes métodos de pré-tratamento, a saber: I) por calor úmido a 105°C, sob 1 atm durante 120 minutos e II) pela adição de soluções ácida, sendo esta elaborada com ácido sulfúrico a 3 mol L⁻¹, pH 1,0. Os pré-tratamentos I e II foram mantidos por 24 horas e após este período de reação tiveram o pH ajustado para 6.5.

4.4.3 Avaliação do pré-tratamento térmico e ácido na produção de hidrogênio por fermentação escura

Os ensaios foram feitos para avaliar a influência e interação de GB e DS na produção de hidrogênio. Todos os ensaios foram realizados de forma descontínua, utilizando frascos de vidro de 50 mL com tampa de silicone como biorreator não instrumentado. A avaliação de dois diferentes métodos de pré-tratamento (térmico e ácido, item 4.4.2.1) foi realizada para determinar o melhor inóculo produtor de hidrogênio. Os reatores foram inoculados com 5 g de SV com inóculo com pré-tratamento ácido e térmico e com diferentes concentrações de substrato, de acordo com a Tabela 4.7, sob condições anaeróbicas a 30°C.

Tabela 4.7. Ensaios experimentais de produção de hidrogênio a partir do glicerol bruto (GB) e os dejetos suínos (DS) com dois diferentes inoculantes

Ensaio com inóculo pré-tratado com ácido (A)	Ensaio com inóculo termicamente pré-tratado (T)	GB (%)	DS (%)
AGB100	TGB100	0	100
ADS100	TDS100	100	0
AGB80	TGB80	80	20
AGB60	TGB60	60	40
AGB40	TGB40	40	60
AGB20	TGB20	20	80

A: pré-tratamento ácido, T: pré-tratamento térmico; GB: glicerol bruto, DS: dejetos suínos.

Fonte: Próprio autor.

4.4.3.1 Planejamento experimental para a produção de hidrogênio com inóculo térmico

Os ensaios para o estudo de fermentação escura (produção de hidrogênio) foram delineados pelo planejamento experimental, usando o delineamento composto central rotacional, conforme apresentado na Tabela 4.8. O planejamento consistiu em dois fatores, quatro pontos axiais e quatro pontos centrais. Os fatores avaliados foram as concentrações do glicerol bruto (GB) e do dejetos suíno (DS).

Tabela 4.8. Matriz do delineamento composto central utilizada para o estudo de produção de hidrogênio empregando glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS) como substrato, contendo quatro pontos axiais e quatro pontos centrais.

Fatores	Axial (-α)	Mínimo (-1)	Ponto central (0)	Máximo (+1)	Axial (+α)
GB (g L ⁻¹)	2,75	4,00	7,00	10,00	11,24
DS (g L ⁻¹)	2,93	5,00	10,00	15,00	17,07

GB: Glicerol Bruto, DS: Dejetos Suínos

Fonte: Próprio autor.

4.5 Solução de nutrientes

Os ensaios de produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia (Item 4.3) e os ensaios de produção de hidrogênio (Item 4.4) foram conduzido utilizando como substratos a combinação de GB/DS e glicose/GB/DS acrescidos de 2,0 mL de solução de nutrientes modificada de acordo com os estudos de AQUINO *et al.* 2007 e CHERNICHARO, 2007 (Tabela 4.9). Os biorreatores foram mantidos fechados para proporcionar um ambiente anaeróbio e em seguida incubados em banho termostaticado a 30±1,0°C até o final da fermentação, a qual foi evidenciada pelo término da produção de gás. O processo fermentativo foi monitorado quanto ao volume de biogás a cada 24h.

Tabela 4.9. Solução de nutrientes utilizada como suplemento nos ensaios fermentativos de produção de biogás

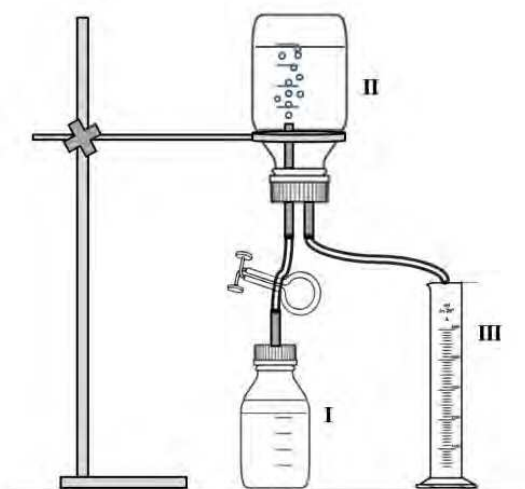
Macronutrientes	Concentração (mg L ⁻¹)	Micronutrientes	Concentração (mg L ⁻¹)
NH ₄ Cl	1.112,0	FeCl ₃ .6H ₂ O	5,00
(NH ₄) H ₂ PO ₄	132,5	ZnCl ₂	0,13
(NH ₄) ₂ HPO ₄	44,50	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,25
MgCl ₂ .6H ₂ O	250,00	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	1,60
CaCl ₂ .2H ₂ O	189,00	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,13
NaHCO ₃	2.500,00	CoCl ₂ .6H ₂ O	5,00
-	-	NiCl ₂ .6H ₂ O	13,00
-	-	H ₃ BO ₃	3,00
-	-	CuCl ₂ .2H ₂ O	8,00
-	-	HCl	1,00

Fonte: Adoptado AQUINO *et al.* (2007)

4.6 Quantificação do volume de biogás

O sistema de aferição de volume de biogás e hidrogênio foi adaptado do trabalho de (AQUINO *et al.*, 2007). O processo foi realizado em frascos de vidro invertido de 250 mL contendo solução de NaOH 3 mol L⁻¹, cuja função foi a captura de CO₂. O frasco apresentava uma tampa adaptada com uma abertura para entrada do gás produzido no biorreator e outra abertura para a saída do líquido deslocado pela entrada do gás (Figura 4.2). As medições foram realizadas a cada 24 horas pelo método de deslocamento de líquido, o qual foi recolhido em uma proveta (Figura 4.2). O volume obtido era então, convertido para volume de biogás normalizado (NmL). Para a quantificação foram consideradas as condições normais de pressão e temperatura (1 atm, 0°C) de acordo com a lei dos gases ideais. Em cada um dos ensaios foram calculados os rendimentos de produção de biogás por cada grama de sólidos voláteis (mL g⁻¹ SV), biogás acumulado (mL) e biogás por cada grama de DQO (mL g⁻¹ de DQO).

Figura 4.2. Aparato utilizado para a determinação do volume de biogás produzido: (I) reator contendo abertura para a saída para o biogás, (II) frasco com solução de NaOH 3 mol L⁻¹ usado para remoção de CO₂ e (III) proveta para quantificação de volume de líquido deslocado pela entrada do biogás.



Fonte: Próprio autor

Os ensaios realizados foram quantificados quanto aos rendimentos de produção de biogás e/ou bio-hidrogênio, de acordo com os itens 4.3 e 4.4, considerando a massa de DQO (Demanda química de oxigênio) e a massa de SV (sólidos voláteis) conforme a Equação (4.1). Os resultados foram expressos em mL g⁻¹DQO ou g SV⁻¹ adicionada no reator e taxas de produção diárias expressados em mL g⁻¹ DQO dia⁻¹ ou g SV⁻¹ dia⁻¹.

$$\text{Biogás ou bio - hidrogênio} = \sum_{n=1} \frac{X_n}{S}$$

Equação (4.1)

Onde

Biogás ou hidrogênio	= Rendimento	mL/gDQO ou
X	=Produção diária de biogás	mL
n	=Unidade de tempo	dia
S	=Quantidade de substrato	g de DQO

4.7 Variáveis de resposta para quantificação de biogás

O teor de biogás (Item 4.6) foi determinado utilizando, além da metodologia de superfície de resposta, o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os

parâmetros C/N (massa de carbono: massa de nitrogênio), I/S (massa de SV do inóculo: massa de SV) e as variáveis de biogás acumulado (mL), biogás por massa da demanda química de oxigênio total (mL gDQO⁻¹), biogás por massa de sólidos voláteis totais (NmL g⁻¹SVtotal), taxa média de produção de biogás (NmL g⁻¹ DQO·d⁻¹) e redução percentual da DQO.

4.8 Quantificação do glicerol e dos ácidos orgânicos

A partir de amostras provenientes do processo fermentativo procedeu-se a quantificação dos teores de glicerol e de ácidos orgânicos. A quantificação foi realizada por análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com uso do sistema Shimadzu Prominence UFLC 20A, equipado com coluna Rezex ROA-ShodexTM (300 x 7,5mm), mantida a 60°C, e acoplado a um detector UV/Vis para análise de ácido orgânicos a 220 nm e, um detector de índice de refração em série para análise de glicerol. O injetor automático foi programado para injeções de 5 µL. A solução de H₂SO₄ 0,0025 mol L⁻¹ foi usada como eluente a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. A identificação do glicerol e dos ácidos orgânicos, bem como, sua quantificação foi realizada com o uso de padrões externos grau analítico.

4.9 Caracterização dos gases do processo fermentativo

A composição dos gases foi determinada por cromatografia gasosa (CG-SRI 8610C) equipada com um detector de condutividade térmica e duas colunas de aço inoxidável com sílica gel (183 cm x 0,32 cm e sombra molecular 13x de 182 cm x 3,175 mm). A temperatura da coluna foi de 40°C por quatro minutos, com uma rampa de 20°C, a cada minuto até atingir 110°C. As temperaturas do injetor e do detector foram de 90°C e 150°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás carreador com fluxo de 20 mL min⁻¹. Foi investigada a presença de metano, hidrogênio, dióxido de carbono e oxigênio.

A produção de gás durante o processo fermentativo foi monitorada por meio do equipamento GEMTM 5000. O aparelho possibilita detectar as porcentagens de metano, dióxido de carbono e oxigênio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia do glicerol bruto e dejetos suínos

5.1.1 Caracterização dos substratos e do inóculo

Na Tabela 5.1 encontram-se os resultados da caracterização físico-química e elementar do GB, DS e do inóculo. O pH alcalino do GB o remete ao processo que lhe deu origem, subproduto da transesterificação de óleo vegetal por catálise homogênea com metóxido de sódio, que resultou em pH extremamente alcalino (10,30 pH). Em se tratando do DS foi observado que o pH se encontrava no limite inferior requerido para o desenvolvimento das bactérias anaeróbias, pH 6,5. O pH do inóculo ficou dentro da faixa requerida com valor de 6,73 pH. Segundo Kondusamy *et al.* (2014) as bactérias anaeróbias se desenvolvem bem em uma faixa de pH de 6,5 a 7,5, pois valores fora desta faixa inibem ou dificultam seu desenvolvimento, já que as arqueobactérias são sensíveis às mudanças de pH. O valor de pH é um importante indicador para avaliar a estabilidade dos sistemas de digestão anaeróbia, pois afeta os micro-organismos acidogênicos e metanogênicos (GLANPRACHA; ANNACHHATRE, 2016; KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014).

O valor de sólidos voláteis e carbono no GB foi cerca de 80% e 40% superior ao contido encontrado no DS, respectivamente (Tabela 5.1). O valor de SV/ST do DS foi de 83,90%, medida indireta de conteúdo de material orgânico que poderá ser convertida a biogás. Por outro lado, não foi encontrada quantidade significativa de nitrogênio no GB (%N <0,05). O percentual de carbono encontrado no GB (88%) não se constitui em um valor típico deste efluente, pois segundo Thompson; He (2006), geralmente os valores se situam entre 24 e 38%. O excedente de carbono encontrado indica que os ácidos orgânicos e saponificados não foram convertidos pelo processo de transesterificação e ainda, que há a presença de ésteres metílicos não recuperados (VALERIO *et al.*, 2015). Também foi observado ainda, que 25% das proteínas provenientes do DS podem ter contribuído como fonte de nitrogênio para o crescimento celular. Segundo Marone *et al.* (2015) e Dennehy *et al.* (2016) a adição de diferentes substratos componentes nutricionais, complementam a codigestão de resíduos, sendo este um procedimento amplamente aplicado para aumentar a produção de biogás, pois a combinação de diferentes substratos podem fornecer nutrientes equilibrados, reduzindo

os custos relacionados ao controle do pH e ao balanço da relação C/N, necessários para otimizar o processo de produção do metano.

Tabela 5.1. Caracterização físico-química e elemental do glicerol bruto (GB), do dejetos suíno (DS) e do inóculo utilizados no processo de codigestão anaeróbia para produção de biogás

Parâmetros	GB	DS	Inóculo
	Média ± Desvio Padrão		
pH	10,30±0,00	6,51±0,54	6,73±0,15
ST (g L ⁻¹)	870,34±0,00	199,86±0,00	80,95±0,11
SV (g L ⁻¹)	870,10±0,00	167,55±0,00	40,72±0,92
SV/ST (%)	99,97	83,90	50,30
DQO (g L ⁻¹)	1974,02±3,10	137,83±1,34	11,92±0,59
Carbono (%)	88,04	49,62	NR
Nitrogênio (%)	<0,05	4,08	NR
Hidrogênio (%)	11,08	6,50	NR
Proteína (%)	<0,05	25,55	NR

ST: Sólidos Totais; SV: Sólidos Voláteis;

DQO: Demanda Química de Oxigênio; NR: Não Realizado.

Fonte: Próprio autor.

5.1.2 Caracterização físico-química dos ensaios de codigestão anaeróbia

O pH dos sistemas de codigestão resultante da combinação dos efluentes, GB e DS, apesar de diferentes, quando analisados individualmente, ao se misturarem, apresentaram resultado que se situam na faixa de 7,1 a 7,6 pH (Tabela 5.2), estando assim dentro do recomendado para um eficiente desempenho das bactérias metanogênicas, na faixa 6-5 a 7.5 (KONDUSAMY; KALAMDHAD, 2014; MAO *et al.*, 2015) durante o processo fermentativo. Outro fato a considerar trata-se de não ter havido a necessidade de ajuste do pH posterior à mistura, diminuindo assim o tempo de adequação das condições do meio fermentativo para os ensaios.

As características físico-químicas obtidas após a mistura dos substratos (GB e DS) utilizados neste estudo para produção de biogás se apresentaram nas faixas de: 4,39 a 11,78 g L⁻¹ de Sólidos Totais (ST); 4,07 a 11,45 g L⁻¹ de Sólidos Voláteis (SV) e 6,12 a 19,41 g L⁻¹ de demanda química de oxigênio (DQO) conforme apresentado na Tabela 5.2. A relação I/S (inóculo/substratos) (Tabela 5.2) apresentou valores de 0,44 a 1,16 e encontra-se em consonância com o valor mínimo recomendado por Labatut *et al.* (2011) que reportam que para assegurar a partida do processo da digestão anaeróbia o mínimo recomendado é de 0,5 I/S.

A relação C/N (carbono/ nitrogênio) obtida no presente estudo variou de 17,88 a 63,63 (Tabela 5.2). Estes valores refletem a relação entre as fontes de carbono e fontes de nitrogênio que compõem o meio fermentativo. De acordo com Guo *et al.* (2018) uma relação C/N elevada conduz a baixas concentrações de amônia livre no sistema, que acarreta a elevação do pH para valores superiores a 7,5. Segundo ZHANG *et al.* (2013) e Elsayed *et al.* (2015), as razões C/N comumente empregadas na digestão anaeróbia se apresentam na faixa de 10 a 35. No substrato glicerol bruto não foi observado oferta de nitrogênio (%N <0,05), sendo assim, sua combinação com o dejetos suíno foi determinante para viabilizar valores de relação C/N maiores que 12:1.

Tabela 5.2. Resultados da caracterização físico-química dos diferentes ensaios da mistura de substratos para a produção de biogás

Ensaio	Relação C/N (g g ⁻¹)	Relação I/S (gSV gSV ⁻¹)	DQO _{total} (g L ⁻¹)	ST _{Total} (g L ⁻¹)	SV _{Total} (g L ⁻¹)	pH _{inicial}
			Média ± Desvio Padrão			
1	29,37	1,16	7,17 ± 0,35	4,48 ± 0,13	4,32 ± 0,08	7,20
2	17,88	0,83	8,98 ± 0,79	6,48 ± 0,29	5,99 ± 0,13	7,15
3	55,22	0,52	16,56 ± 0,35	9,70 ± 0,39	9,54 ± 0,37	7,27
4	26,50	0,45	18,37 ± 0,26	11,70 ± 0,80	11,21 ± 0,67	7,51
5	18,06	1,23	6,12 ± 0,18	4,39 ± 0,37	4,07 ± 0,36	7,40
6	36,35	0,44	19,41 ± 0,35	11,78 ± 1,15	11,45 ± 1,07	7,00
7	63,63	0,76	11,49 ± 0,78	6,68 ± 0,70	6,58 ± 0,74	7,57
8	20,97	0,56	14,05 ± 0,10	9,50 ± 1,07	8,95 ± 0,97	7,19
9	27,22	0,64	12,77 ± 0,47	8,09 ± 0,27	7,77 ± 0,27	7,48
10	27,22	0,64	12,77 ± 0,47	8,09 ± 0,27	7,77 ± 0,27	7,36
11	27,22	0,64	12,77 ± 0,47	8,09 ± 0,27	7,77 ± 0,27	7,50
12	27,22	0,64	12,77 ± 0,47	8,09 ± 0,27	7,77 ± 0,27	7,60

GB: Glicerol Bruto, DS: Dejetos Suíno, DQO: Demanda Química de Oxigênio, ST: Sólidos Totais, SV: Sólidos Voláteis.

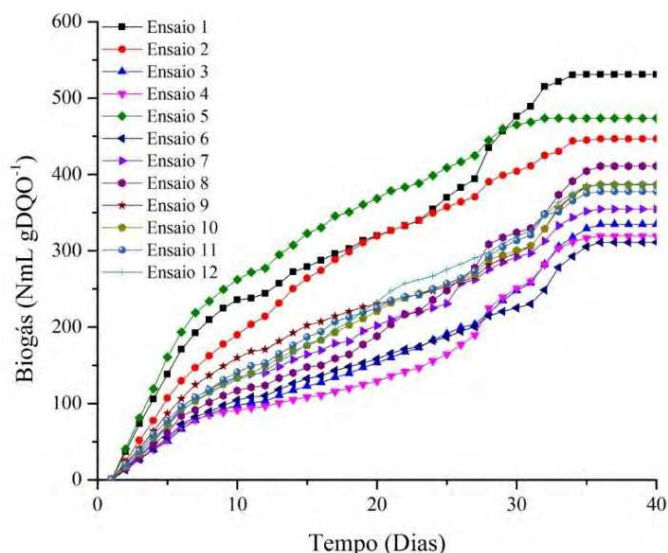
Fonte: Próprio autor.

5.1.3 Avaliação da produção de biogás

Na Figura 5.1 encontram-se ilustradas as curvas de progresso da produção de biogás por massa de DQO. Nestas não foram observadas em nenhuma condição de ensaio a presença de fase “lag”, fase de adaptação celular. Este fato se constituiu em um fator positivo por não apresentar restrição para o início imediato da produção de gás. Este fato levou a crer que ocorreu uma rápida adaptação dos micro-organismos as condições e ao meio fermentativo. O processo fermentativo durou 40 dias, sendo que após o início da fermentação, até o sexto dia foram observadas as maiores taxas de

produção de gás para todos os ensaios de codigestão anaeróbia (Figura 5.1). Logo a seguir foi observado um decréscimo na produção de gás, porém com velocidade constante. Após o 35º dia de fermentação todos os sistemas entraram em estado estacionário, indicando o final do bioprocessos.

Figura 5.1. Perfil da produção de biogás nos diferentes ensaios de codigestão anaeróbia.



Ensaio 1 (7,17 gDQO L⁻¹); Ensaio 2 (8,98 gDQO L⁻¹); Ensaio 3 (16,56 gDQO L⁻¹); Ensaio 4 (18,37 gDQO L⁻¹); Ensaio 5 (6,12 gDQO L⁻¹); Ensaio 6 (19,41 gDQO L⁻¹); Ensaio 7 (11,49 g DQO L⁻¹); Ensaio 8 (14,05 gDQO L⁻¹); Ensaio 9 (12,77 gDQO L⁻¹); Ensaio10 (12,77 gDQO L⁻¹); Ensaio 11 (12,77 gDQO L⁻¹); Ensaio 12 (12,77 gDQO L⁻¹).

Os resultados de produção de biogás se apresentaram nas faixas de 278,19 a 521,46 NmL por grama de DQOtotal ou na faixa de, 458,38 a 834,57 NmL por grama de SVTotal (Tabela 5.3). As taxas de produção diária de biogás variaram de 8,64 a 14,75 NmL gDQO⁻¹ dia⁻¹ (Tabela 5.3). Os melhores resultados de rendimento de biogás foram observados nos ensaios 1 com carga orgânica de 7,17 gDQO, no ensaio 2 com 8,98 gDQO e no ensaio 5 com 6,12 gDQO com produção de 521,46 NmL gDQO⁻¹, 430,02 NmL gDQO⁻¹ e 473,70 NmL gDQO⁻¹, respectivamente, com taxas de produção média de 14,75 NmL gDQO⁻¹ d⁻¹, 12,40 NmL gDQO⁻¹ d⁻¹ e 13,16 NmL gDQO⁻¹ d⁻¹ (Tabela 5.3). Na condição do ensaio 1 a proporção entre DS e GB foi de 5:4, sendo a proporção de GB maior (4 g L⁻¹) quando comparada com os resultados provenientes do estudo realizado por Astals *et al.* (2011). Tais autores, obtiveram 215 NmL gDQO⁻¹ como resultado em processo de codigestão anaeróbia utilizando DS e GB, misturados, como os substratos, na proporção de 4:1. Kafle; Kim, (2013) obtiveram produção de biogás a partir da combinação de DS (77%) e resíduos de maçã (33%) de 398 NmL gDQO⁻¹ e 505,46 NmL gDQO⁻¹, em condições de temperatura mesófilas (36,5°C) e

termófilas (55°C). Nesse sentido os resultados obtidos no presente estudo foram vantajosos em comparação ao dos autores mencionados, pois utilizando condições mesófilas (30°C) e maior concentração de glicerol bruto (4 g L⁻¹) foram obtidos 521,46 NmL gDQO⁻¹.

Os maiores valores de produção de biogás por massa de DQO_{total} foram observados nos ensaios 1 (7,17 gDQO L⁻¹), 2 (8,98 gDQO L⁻¹) e 5 (6,12 gDQO L⁻¹) (Tabela 5.3), que apresentaram relação C/N de 29,4; 17,9 e 18,1, respectivamente (Tabela 5.3). Os ensaios 3 (16,56 gDQO L⁻¹), 6 (19,41 gDQO L⁻¹) e 7 (11,49 gDQO L⁻¹), que apresentaram o maior valor da relação C/N de 36 (Tabela 5.3), encontravam-se entre aqueles com os menores valores de produção de biogás por grama de DQO_{total} (Tabela 5.3). Vários autores relataram que a relação C/N ótima para a digestão anaeróbia se situam entre 20 a 35 (MAO *et al.*, 2015; PANICHNUMSIN *et al.*, 2010, 2012). A relação C/N é um parâmetro relevante na digestão anaeróbia, pois sua limitação pode ser um entrave na eficiência da biodigestão do glicerol bruto puro. A limitação de carbono poderia restringir a eficiência da conversão do dejetos suíno puro em biogás e o conteúdo de nitrogênio influencia no desenvolvimento das bactérias.

Tabela 5.3. Resultados dos ensaios finais de produção de biogás conduzidos com diferentes concentrações de glicerol bruto e dejetos suíno em processo de codigestão anaeróbia.

Parâmetros finais						
Ensaio	Biogás (mL)	Biogás (mL gDQO ⁻¹)	Taxa Biogás (mL gDQO ⁻¹ d ⁻¹)	Biogás (mL gSV ⁻¹)	pH final	Redução da DQO (%)
1	93,45	521,46	14,75	834,57	6,80	32,74
2	96,55	430,02	12,40	595,92	7,00	53,27
3	126,53	305,62	9,29	521,76	6,48	77,38
4	139,24	303,14	8,87	475,96	6,65	70,49
5	72,45	473,70	13,16	660,37	6,94	30,18
6	134,98	278,19	8,64	458,38	6,54	79,92
7	95,62	332,91	9,85	572,63	6,16	71,31
8	131,18	373,41	11,41	552,25	6,46	60,53
9	113,90	356,76	10,75	563,14	6,37	64,01
10	113,36	355,06	10,74	560,46	6,36	66,16
11	112,04	350,94	10,49	553,96	6,34	68,32
12	116,00	363,31	10,73	573,48	6,48	67,14

DQO: Demanda Química de Oxigênio, SV: Sólidos Voláteis.

Fonte: Próprio autor.

Neste sentido, o uso combinado do DS, que possui de nitrogênio (4%), com o GB, com elevado teor de carbono (88%), pode ter contribuído para os valores observados de produção de biogás. Entretanto, a relação C/N isoladamente não mostrou efeito linear significativo (0.111) sobre a produção do biogás, porque os coeficientes de correlação de Pearson (r) com as respostas avaliadas foram desprezíveis ou fracos ($r < 0,5$) (Tabela 5.4). Por outro lado, a relação I/S não mostrou efeito linear significativo (0.925) sobre a produção de biogás (Biogás NmL) (Tabela 5.4), pois o valor de r entre a relação I/S e a produção de biogás por grama de DQO foi de 0,925. Este fato denota que a relação I/S pode ter exercido um papel efetivo e positivo no rendimento de biogás por grama de DQO. O mesmo efeito foi observado sobre o rendimento de biogás por g^{-1} SVtotal, devido a que o efeito exercido pela relação I/S sobre o rendimento de biogás teve um valor negativo ($r = -0,926$). Uma possível explicação para esta observação é que os micro-organismos podem ter sido reprimidos pela restrição de nutrientes, algo que pode ter acontecido nos ensaios de número 1 (7,17 gDQO L^{-1}), 2 (8,98 gDQO L^{-1}) e 5 (6,12 gDQO L^{-1}) que tiveram menor aporte de GB.

Tabela 5.4. Valores dos coeficientes de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros C/N e I/S e, as variáveis de resposta avaliadas

Variáveis	Volume de Biogás (NmL)	Biogás (NmL gDQO _{total} ⁻¹)	Biogás (NmL gSV _{total} ⁻¹)	Taxa de produção de biogás (NmL gDQO _{total} ⁻¹ d ⁻¹)	Redução da DQO _{total} (%)
Relação C/N	0,111	-0,464	-0,196	-0,476	0,511
Relação I/S	-0,926	0,925	0,882	-0,462	-0,935
Redução da DQO _{total}	0,773	-0,966	-0,860	-0,943	1,000

C/N: relação massa de carbono: massa de nitrogênio; I/S: relação massa de SV do inóculo: massa de SV do substrato; DQO: demanda química de oxigênio; SV: sólidos voláteis.

Fonte: Próprio autor.

Considerando à redução da carga orgânica (DQO) após a codigestão anaeróbica foi possível notar que nos ensaios onde houve a produção de maior volume de biogás ocorreu também, os maiores valores de redução percentual da DQO (Tabela 5.3) apresentando correlação de Pearson forte e positiva (Tabela 5.4). No entanto, os ensaios com menor redução de carga orgânica apresentaram os maiores valores de produção de biogás por massa de DQO (Tabela 5.3) e correlação de Pearson forte e

negativa (Tabela 5.4). A correlação de Pearson entre a redução da DQO e a taxa média de produção de biogás também foi forte e negativa (Tabela 5.4). Provavelmente as taxas elevadas de conversão inicial da matéria orgânica em biogás podem ter esgotado alguns nutrientes e assim, afetado a redução da DQO. É fato também, que os ensaios com menor redução da DQO foram aqueles com menor carga de GB. Aquele fato manteve uma baixa produção de biogás no sistema de digestão anaeróbia utilizando dejetos suínos que apresente baixas razões C/N (FIERRO *et al.*, 2016).

Baseado nos valores de pH medidos ao final dos 40 dias de processo fermentativo, que variou de 6,16 a 7,00 (Tabela 5.3), pode-se dizer que a mistura dos efluentes contribuiu para a estabilização do pH. Este fato sugere que o processo de produção de biogás foi favorável, pois não ocorreu acidificação no processo de digestão anaeróbia.

5.1.4 Análise da curva de superfície de resposta para a produção de biogás

O ajuste do modelo polinomial gerado dos valores de produção de biogás foi em função da combinação de diferentes concentrações do GB e DS, gerando o coeficiente de determinação (R^2_{adj}) de 0,90. A análise da ANOVA revelou que os efeitos quadráticos e a interação das concentrações de GB e DS não foram significativos para $p\text{-valor}=0,05$ (Tabela 5.5). Entretanto, os efeitos lineares das concentrações de GB e DS foram significativos e positivos (Figura 5.2). Por esses motivos, foi utilizada no segundo momento a regressão linear para ajuste de modelo que explicasse o comportamento da produção de biogás. O ajuste do modelo linear gerado (Equação 5.1) para os dados experimentais resultou em coeficiente de determinação (R^2_{adj}) de 0,89. O coeficiente de correlação (R^2) entre os valores observados experimentalmente e aqueles preditos pelo modelo linear ajustado foi de 0,91 (Tabela 5.5).

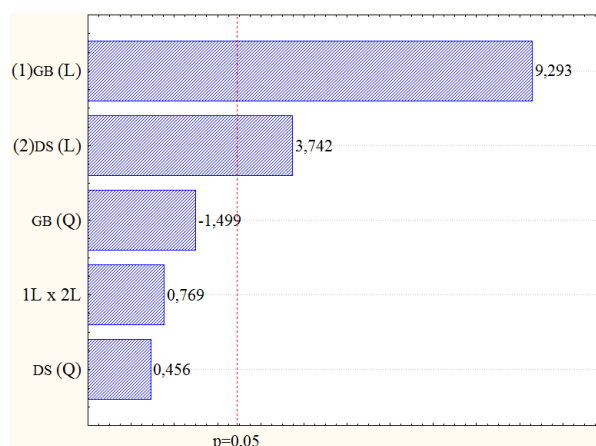
Tabela 5.5. Análise de variância (ANOVA) do modelo polinomial aplicado aos dados de produção de biogás do processo de codigestão anaeróbia da combinação GB e DS.

Fatores	SQ	GL	QM	F	p-valor
GB (L)	3369,16	1,00	3369,16	86,37	0,00
GB (Q)	87,72	1,00	87,72	2,25	0,18
DS (L)	546,27	1,00	546,27	14,00	0,01
DS(Q)	8,12	1,00	8,12	0,21	0,66
GB & DS	23,08	1,00	23,08	0,59	0,47
Erro	234,06	6,00	39,01		
Total SS	4286,06	11,00			

SQ: soma de quadrados, GL: grau de liberdade, QM: quadrados médios,
GB: glicerol bruto, DS: dejetos suínos.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.2. Gráfico de Pareto com os efeitos lineares e quadráticos, além do efeito de interação, dos fatores concentração de GB e DS sobre a produção normalizada de biogás.



Fonte: Próprio do autor.

$$y = 47,70 + 6,84x_1 + 1,65x_2$$

Equação 5.1

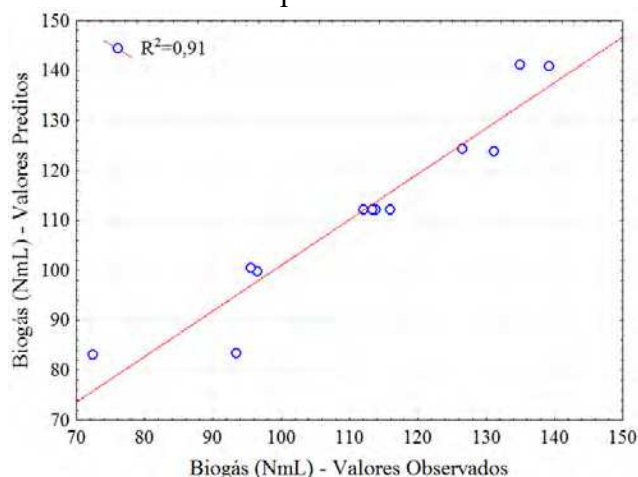
Onde,

y é o valor de biogás (NmL)

x_1 é a concentração de GB (g L^{-1})

x_2 é a concentração de DS (g L^{-1})

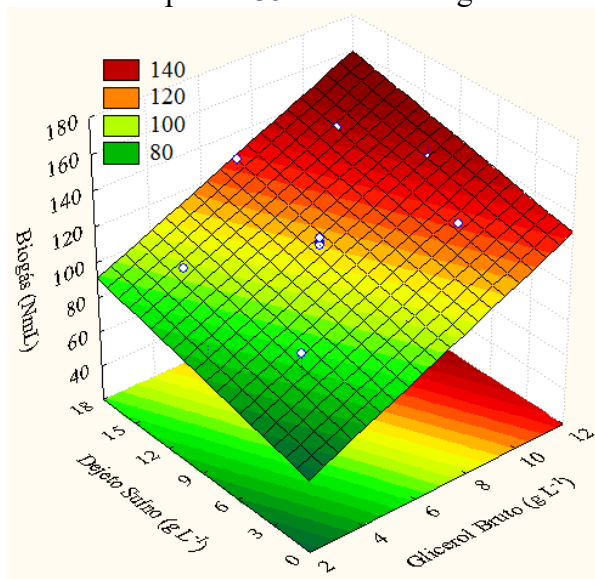
Figura 5.3. Gráfico de correlação entre os valores preditos pelo modelo ajustado (equação 5.1) e os valores observados experimentalmente.



Fonte: Próprio do autor.

Ao analisar o gráfico de superfície de resposta gerado a partir da Equação 5.1 foi possível observar o efeito positivo das concentrações de DS e GB sobre a produção de biogás (Figura 5.4). Os maiores valores de produção de biogás foram observados na região gráfica que combina concentrações de GB e DS apresentando valores superiores a 10 g L^{-1} e 15 g L^{-1} , respectivamente. Nessa região foi possível atingir valores de produção maiores que 139 NmL de biogás. Como não houve região de máxima inflexão na curva de superfície, acredita-se que tenha ocorrido um ganho de produção de biogás com o aumento dos percentuais de GB e DS.

Figura 5.4. Curva de superfície de resposta ajustada para a produção de biogás com as diferentes misturas de GB e DS após os 35º dias de codigestão anaeróbia.

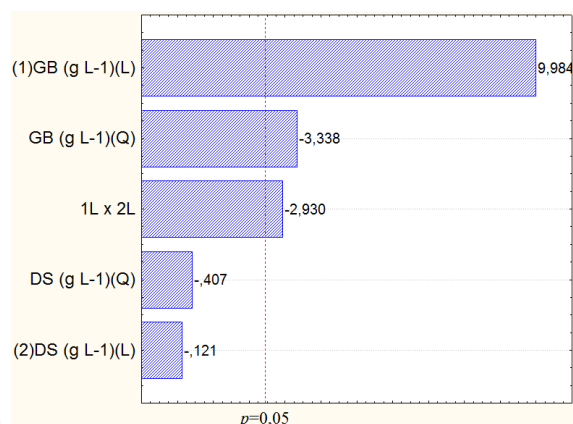


Fonte: Próprio do autor.

5.1.5 Avaliação da codigestão anaeróbia para o tratamento do glicerol bruto

O tratamento dos dados obtidos para a variável dependente DQO resultou em um modelo ajustado com coeficiente de determinação (R^2_{adj}) igual a 0,91 quando considerados os efeitos lineares, quadráticos e interação. De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 5.5), o efeito linear e quadrático da concentração do DS não foi significativo ($p\text{-valor} > 0,05$). O efeito da interação entre o DS e o GB foi negativo e significativo ($p\text{-valor} < 0,05$) (Figura 5.5). Uma nova modelagem de dados foi realizada retirando os componentes não significativos, o que resultou na Equação 5.2, com $R^2_{adj}=0,93$. A avaliação da ANOVA (Tabela 5.6) ratificou os efeitos significativos nos termos linear e quadrático da concentração do GB e da interação entre as concentrações de GB e DS.

Figura 5.5. Gráfico de Pareto com os efeitos lineares e quadráticos, além do efeito de interação, dos fatores concentração de GB e DS sobre a redução da carga orgânica



(DQO) após a codigestão anaeróbia.

Fonte: Próprio autor.

$$Y = -5,48 + 15,3x_1 - 0,67x_1^2 - 0,04x_1x_2$$

Equação 5.2

Onde

Y = Redução da DQO%;

x_1 e x_2 = concentração de GB e DS, respectivamente.

Tabela 5.6. Análise de variância (ANOVA) do modelo polinomial (Equação 5.2) aplicado aos dados obtidos no processo de codigestão anaeróbia de GB e DS relativos à redução percentual da DQO.

Fatores	SQ	GL	QM	F	p-valor
GB (L)	2181,97	1,00	2181,97	129,03	0,00
GB (Q)	241,86	1,00	241,86	14,30	0,00
GB & DS	187,96	1,00	187,96	11,11	0,01
Erro	135,28	8,00	16,91		
Total SS	2750,63	11,00			

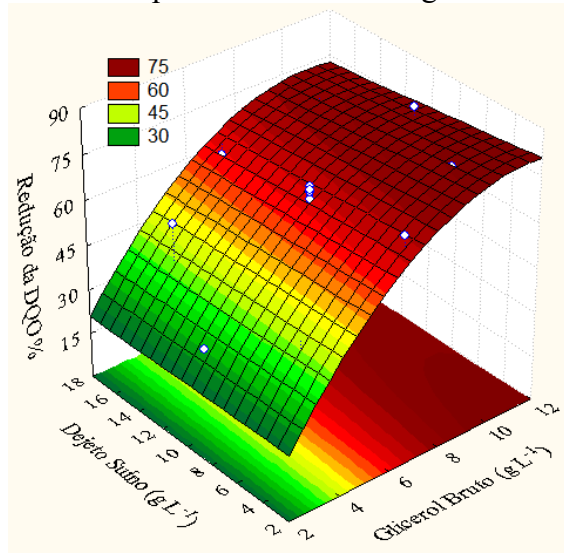
SQ: soma de quadrados, GL: grau de liberdade, QM: quadrados médios, GB: glicerol bruto, DS: dejetos suíno.

Fonte: Próprio autor.

A análise do gráfico de superfície de resposta (Figura 5.6) para o efeito da concentração de GB e DS sobre a redução da DQO da mistura de efluentes, após a codigestão anaeróbia, obtido com uso da Equação 31, mostrou que a contribuição do DS foi desprezível dentro dos limites avaliados. Além disso, foi possível observar que a redução da DQO foi proporcional à carga de GB até o limite de 10 g L⁻¹. Considerando

que a concentração de GB apresentou efeito quadrático negativo e significativo (p -valor $<0,05$), é provável que valores de concentração de GB, superiores a 10 g L^{-1} , possam ter inibido a codigestão pelo elevado teor de DQO ($1974,02 \text{ g L}^{-1}$).

Figura 5.6. Curva de superfície de resposta ajustada para a variável DQO frente às diferentes misturas de GB e DS após o 35º dia de codigestão anaeróbia



Fonte: Próprio autor.

Os ensaios de codigestão anaeróbia se mostraram capazes de reduzir a DQO de $1944,02 \text{ mg L}^{-1}$ para 390 mg L^{-1} (79.92% de redução) na condição estabelecida para o ensaio 6 ($19,41 \text{ gDQO L}^{-1}$). As maiores reduções da carga orgânica ocorreram com valores de concentração de GB de 10 a $11,2 \text{ g L}^{-1}$, independentemente dos valores de DS avaliados. Nesta região da curva de superfície de resposta foi possível uma redução dos valores de DQO de 60 a 65% (Figura 5.6).

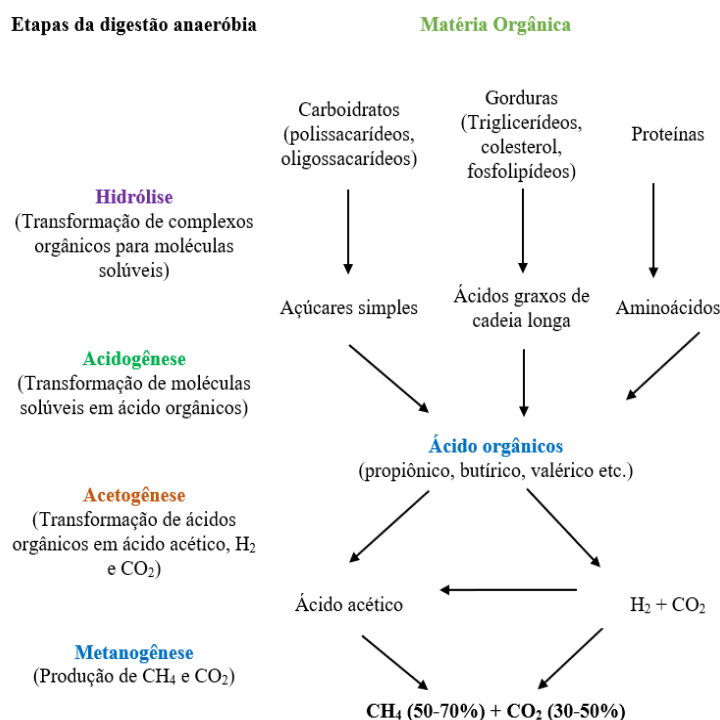
5.1.6 Produção de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são metabólitos intermediários chave, que são produzidos durante a digestão anaeróbia. O ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e iso-valérico são comumente produzidos durante as etapas de hidrólise e acidogênese. De acordo com Kondusamy; Kalamdhad, (2014) e Mao *et al.* (2015) concentrações baixas de ácidos orgânicos (ácido butírico, ácido valérico, ácido acético, entre outros) indicam um equilíbrio entre a hidrólise/acidogênese e a metanogênese, fato que favorece a produção de biogás (metano e dióxido de carbono) (Figura 5.7).

Em se tratando da produção de ácido orgânicos observou-se que o ensaio 6 ($19,41 \text{ gDQO L}^{-1}$) foi o único que apresentou acúmulo de ácido acético (48 g L^{-1}) após o 35º dia de processo codigestão. Esse ensaio se destacou dos demais por ser o que utilizou a maior quantidade de GB ($11,2 \text{ g L}^{-1}$) no meio (Tabela 5.3) e, ser o que apresentou a menor quantidade de biogás produzido ($278,2 \text{ NmL g}^{-1} \text{ DQOTotal}$) (Tabela 5.3). Segundo Tian *et al.*, (2015) e Marchaim; Krause, (1993), uma elevada concentração de ácidos orgânicos produzidos durante o processo de digestão anaeróbia inibe o desenvolvimento da microbiota no meio fermentativo, tal fato também foi observado no ensaio 6.

Figura 5.7. Etapas da produção de biogás durante a biodigestão anaeróbica convencional.

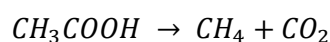
Modificado de (KONDUSAMY; KALAMDHAD (2014); MAO *et al.* (2015).



Fonte: Próprio autor.

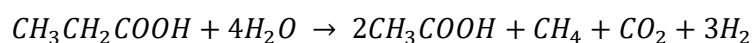
Segundo alguns autores (KHALID *et al.*, 2011; KONRAD *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011a, 2012), dentre os vários ácidos orgânicos produzidos durante o processo, o ácido propiônico pode ser o inibidor mais forte da produção de biogás. Konrad *et al.*, (2014) reportam que durante o processo de digestão anaeróbia, a degradação do ácido propiônico pode ser muito mais lenta do que a do acético, o qual posteriormente será convertido em metano e gás carbônico (Equação 5.3). Estes autores

mencionam ainda, que, o ácido propiônico pode ser degradado a ácido acético antes de ser gerado o gás metano (Figura 5.7) e que a concentração tolerada pelas bactérias metanogênicas é abaixo de 1 g L⁻¹ de ácido propiônico. Neste sentido os resultados obtidos revelaram que entre os ácidos orgânicos quantificados não foi detectado o ácido propiônico ao final do processo. Este fato pode ser atribuído a uma baixa concentração destes compostos, em uma faixa tolerada pelas bactérias metanogênicas e ainda, ao seu consumo durante o bioprocessamento, que gera ácido acético, o qual posteriormente é convertido em biogás (metano e dióxido de carbono) (Equação 5.3 e Equação 5.4).



Equação 5.3

$$\Delta G^0 = -31.0 \text{ kJ mol}^{-1}$$



Equação 5.4

$$\Delta G^0 = +76.1 \text{ kJ mol}^{-1}$$

5.2 Produção de biogás com aumento de 50% da carga orgânica de glicerol bruto e dejetos suínos

5.2.1 Caracterização do glicerol bruto e dejetos suínos

Os substratos estudados apresentaram os seguintes valores quanto a suas características físico-químicas:

O pH do glicerol bruto (GB) resultou em um pH alcalino, aproximadamente de 10,3 enquanto, o dejetos suíno apresentou pH de 6,92, estando este dentro da faixa aceitável para ser usado no processo de digestão anaeróbica. Conforme descrito por Bharathiraja *et al.* (2016) as bactérias metanogênicas hidrogenotrófica e acetoclástica podem se desenvolver com sucesso em sistemas de digestão com pH na faixa entre 6,5 a 7,5, pois, fora desta faixa diminuem assim sua capacidade de produzir biogás.

O valor dos sólidos voláteis do GB foi de 0.90 g g^{-1} , devido ao elevado teor de matéria orgânica facilmente biodegradável. O DS apresentou 0.83 g g^{-1} de teor de matéria orgânica na sua composição, valor inferior ao obtido para o GB. Desta forma foi observado que o GB é um substrato promissor para fermentação anaeróbia devido ao seu elevado teor de energia ($6,854.60 \text{ Kcal Kg}^{-1}$) e elevada concentração de DQO de $1823,12 \text{ g L}^{-1}$. No entanto, devido à ausência de nitrogênio em forma de amônia ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 5.7) foi necessária a adição de um resíduo complementar para fins de aumentar o teor de nitrogênio. Em se tratando do DS foi observado que trata-se de um resíduo orgânico promissor como cosubstrato na codigestão anaeróbia, pois apresenta elevada concentração de matéria orgânica de $171,26 \text{ g DQO L}^{-1}$, de amônia com 1400 mg L^{-1} e elevado poder calorífico de $5417,24 \text{ Kcal Kg}^{-1}$ (Tabela 5.7). A codigestão anaeróbia é um dos tratamentos de resíduos orgânicos mais eficiente por apresentar elevado conteúdo de amônia (FIERRO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014b). De acordo com Marone *et al.* (2015) e Astals *et al.* (2014), a adição de dejetos suínos, como cosubstrato complementar, tem efeito positivo pela sua contribuição nutricional e, ainda, por complementar os substratos deficientes em nitrogênio no processo anaeróbio, levando-o a uma maior conversão a biogás.

Tabela 5.7. Caracterização físico-química dos resíduos orgânicos (GB/DS) utilizados como substratos na produção de biogás

Substratos	DQO (g L ⁻¹)	ST (g L ⁻¹)	SV (g L ⁻¹)	SV/ST	pH	Poder calorífico (Kcal kg ⁻¹)	Amônia (mg L ⁻¹)
DS	171,26±3,4	255,97±1,2	211,43±2,7	0,83	6,92±0,2	5417,24	1400±1,1
GB	1823,12±6,3	717,99±4,1	649,12±2,1	0,90	10,3±0,3	6854,60	0,0±0,0
Inóculo	13,50±0,8	16,50±0,03	9,03±0,1	0,55	6,8±0,1	N/D	N/D

N/D não determinado

Fonte: Próprio autor.

5.2.2 Rendimentos de metano

A Tabela 5.8 e Figura 5.8 ilustram os resultados de produção de biogás com diferentes proporções GB/DS. Os melhores rendimentos de metano foram obtidos no ensaio 1 (6 GB: DS 7,5), ensaio 2 (6 GB: 22,5 DS), ensaio 4 (15GB: DS 22,5) e ensaio 5 (3,75 GB: DS 15) com 340,01 mL g⁻¹ de DQO, 330,33 mL g⁻¹ de DQO, 344,13 mL g⁻¹ de DQO e 328,62 mL g⁻¹ de DQO, respectivamente. Em contraste, os ensaios 3 e ensaios 6-9 tiveram um desempenho inferior a 287 mL g⁻¹ de DQO e um tempo de produção de biogás mais longo, aproximadamente de 10 dias, em comparação dos demais ensaios (Tabela 5.8 e Figura 5.8). No ensaio 1 se obteve um rendimento de biogás de 749,02 mL g SV⁻¹ adicionado ao reator, com uma relação GB/DS de 0,80, uma relação inóculo/substrato (I/S) de 0,91 g g⁻¹, utilizando a concentração de 6 g L⁻¹ GB e de 7,5 g L⁻¹ DS (Tabela 5.8). No entanto, no ensaios de produção de biogás (item 5.1.3) o ensaio 1 com a mesma relação GB/DS de 0,80 g g⁻¹, uma relação inóculo/substrato (I/S) de 1,16 g g⁻¹ e uma concentração de 4 g L⁻¹ de GB e 5 g L⁻¹ de DS gerou biogás com um rendimento final de 834,57 mL de g⁻¹ SV. O resultado foi inferior ao resultado obtido neste estudo. É provável que o aumento na carga orgânica da combinação de resíduos (GB/DS) e a mesma concentração do inóculo (5 g de SV L⁻¹) gerou um resultado inferior a 834,57 mL g⁻¹SV. Entretanto, neste estudo observou-se que no ensaios 6, quando diminui a concentração de GB para 3,75 g L⁻¹ e aumentar a concentração de DS para 15 g L⁻¹ e a relação I/S de 0,89 tem efeitos positivos sobre a produção de biogás, com um rendimento máximo de 849 mL g⁻¹ SV e 328 mL de metano por grama de DQO e uma conversão dos substratos a biogás de 93,89% (Tabela 5.8). Deve-se notar que, o ensaio 5 foi um dos melhores ensaios de produção de biogás

com estabilidade do pH durante todo o processo de codigestão anaeróbica, sem a necessidade de usar um agente químico para regular o pH. O teste 1 neste estudo, também, foi o melhor em termos de produção de biogás, mas durante o processo de digestão foi necessária a intervenção de um agente químico para regular o pH.

A produção de biogás é aumentada quando a microbiota anaeróbia está em concentração suficiente no sistema anaeróbio; como observado na , uma relação I/S mínima de 0,345 g g⁻¹ foi necessária para gerar biogás, mas o melhor resultado de produção de biogás foi observado no ensaio 5 com uma relação I/S de 0,89 g g⁻¹. Deve-se notar que o inóculo usado neste estudo foi obtido de um digestor anaeróbio de uma estação de tratamento de esgoto (ETE). Geralmente a microbiota, de uma ETE, está adaptada para consumir resíduos com um elevado teor de hidratos de carbono, lipídios e proteínas. Portanto, para garantir uma produção de biogás (metano e dióxido de carbono) no ensaio 5 com mistura de GB/DS de 18,75 g L⁻¹, é necessária uma concentração de inóculo de 5 g L⁻¹ de SV dentro do reator e uma relação I/S de 0,89 g g⁻¹. Segundo Zeng *et al.* (2010), os autores mostraram que uma relação mínima de I/S de 0,5 g g⁻¹ foi necessária para produzir biogás a partir de *Microcystis spp.*, com a concentração de inóculo de 3 g SV L⁻¹. Portanto, autores sugerem que a relação I/S é um fator fundamental que contribui substancialmente para aumentar a quantidade de biogás durante a digestão anaeróbica (ESKICIOGLU; GHORBANI, 2011; NGHIEM *et al.*, 2014).

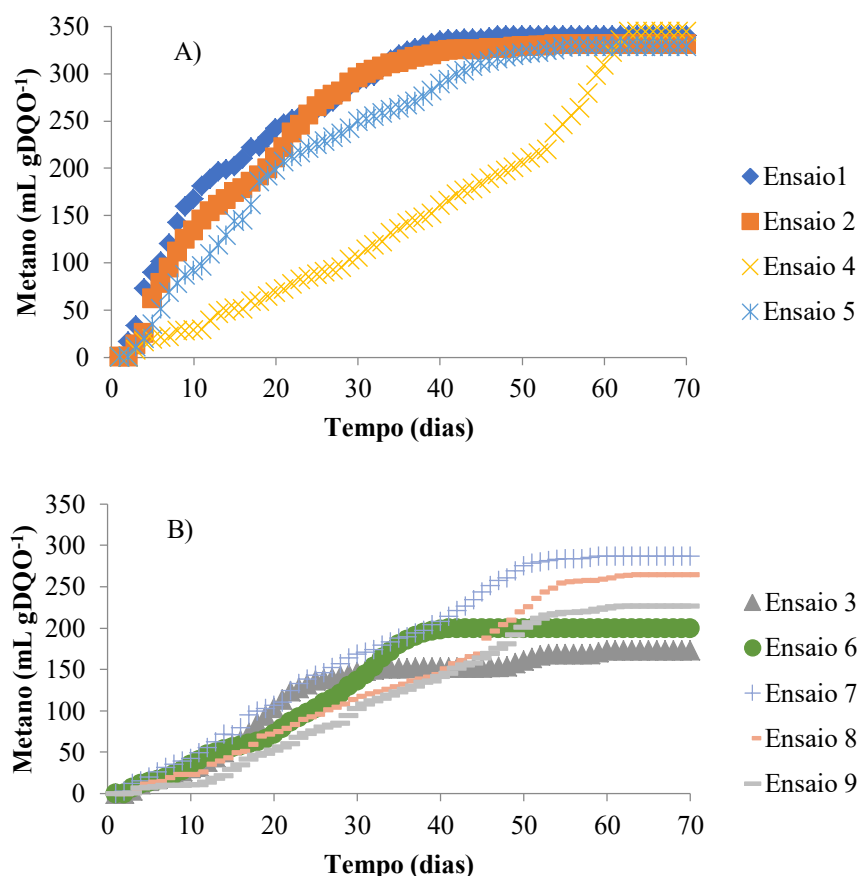
Tabela 5.8. Resultados obtidos da codigestão anaeróbia da mistura de glicerol bruto e dejetos suíno na produção de biogás

Ensaio	Relação I/S (g g ⁻¹)	Acumulado (mL)	Biogás (mL g SV ⁻¹)	Metano (mL g DQO ⁻¹)	Metano (%)
1	0,91	272,08±10,36	749,02±42,43	340,01±5,52	61.90
2	0,57	339,42±13,60	611,63±85,90	330,33±8,05	59.31
3	0,44	245,90±23,86	388,03±71,99	172,75±4,82	55.43
4	0,34	480,06±9,05	675,29±13,92	344,13±12,31	52.04
5	0,89	408,02±12,97	849,23±18,59	328,62±8,56	61.33
6	0,35	402,71±6,59	575,23±14,83	199,48±8,69	60.68
7	0,64	444,15±5,55	836,00±6,89	287,13±6,45	71.94
8	0,40	233,77±20,86	707,47±8,68	264,38±12,45	69.95
9	0,50	332,55±6,78	554,96±21,24	226,75±16,38	72.16
10	0,50	332,55±6,78	554,96±21,24	226,75±16,38	72.16
11	0,50	332,55±6,78	554,96±21,24	226,75±16,38	72.16
12	0,50	332,55±6,78	554,96±21,24	226,75±16,38	72.16

Fonte: Próprio autor.

Os resultados demonstram que todos os ensaios podem gerar o mesmo rendimento de metano na digestão anaeróbia (Tabela 5.8). No entanto, nem todos os ensaios podem ter o mesmo desempenho; uma concentração maior de glicerol (3.5 g L^{-1}) aumentará a concentração de hidrogênio e ácidos orgânicos, com probabilidade acidificar o processo anaeróbio nos primeiros dias da codigestão anaeróbia. Conforme relatado por Ogejo; Li (2010), a porcentagem de metano no biogás encontra-se na faixa de 50-70% e o gás carbônico na faixa de 50-30%. Embora todos os ensaios tenham uma porcentagem aproximada de metano, os ensaios 3 (15g GB/ 7,5g DS), 7 (10,50g GB/ 4,38 g DS) e 9 (10,50 g GB/ 15,00g DS) não mantiveram a estabilidade no reator no processo de codigestão anaeróbia.

Figura 5.8. Cinética do potencial bioquímico de metano da codigestão anaeróbia de dejetos suíno e glicerol bruto aos 70 dias de fermentação.

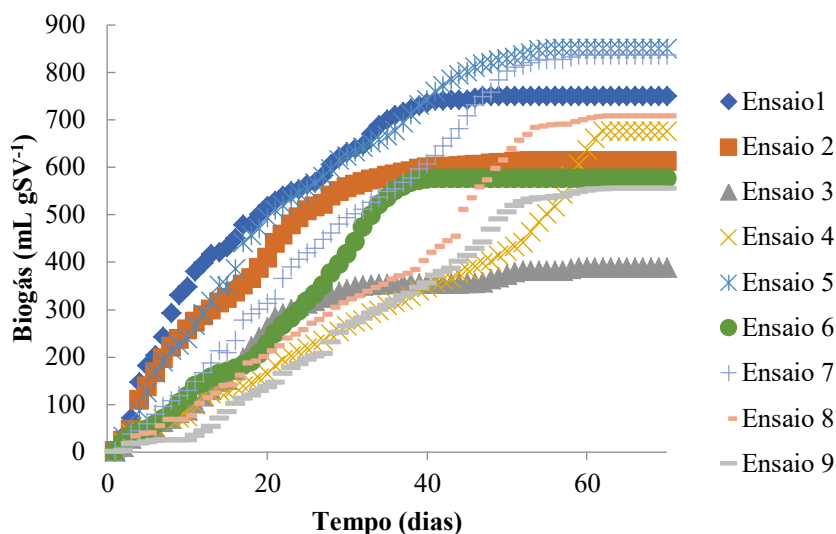


Ensaio 1 (6g GB/ 7,5g DS), ensaio 2 (6g GB/ 22,5g DS), ensaio 3 (15g GB/ 7,5g DS), ensaio 4 (15g GB/ 22,5g DS), ensaio 5 (3,75g GB/ 15g DS), ensaio 6 (16,86g GB/ 15g DS), ensaio 7 (10,50g GB/ 4,39g DS), ensaio 8 (10,50g GB/ 25,61g DS), ensaio 9 (10,50g GB/ 15g DS), ensaio 10 (10,50g GB/ 15g DS), ensaio 11 (10,50g GB/ 15g DS), ensaio 12 (10,50g GB/ 15g DS).

Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 5.8 e na Figura 5.9 observa-se que os melhores resultados de produção de biogás foram os ensaios 1 e 7 com 749,02 mL g⁻¹ SV e 836,00 mL g⁻¹ SV, respectivamente. Neste estudo, foi observado que o aumento da carga orgânica no ensaio 3 (22,50 g L⁻¹) e da concentração de GB (15 g L⁻¹) na codigestão anaeróbia (Figura 5.9) aumenta a probabilidade de que o meio seja acidificado (pH < 6,5), pelo aumento de ácidos orgânicos (ácido butírico, ácido acético, ácido valérico) e a baixa relação carbono/nitrogênio (C/N) (relação C/N<18) dentro do reator. Segundo alguns autores, a melhor faixa estudada da relação C/N está na entre 15-35, adequada para a digestão e codigestão anaeróbica de resíduos agroindustriais (WANG *et al.*, 2014). No item 5.1 a melhor produção de biogás foi de 834.57 mL g⁻¹ de SV no ensaio 1 usando 9 g da combinação de 4 g L⁻¹ GB e 5 g L⁻¹ EP e uma relação C/N de 29,37. Neste resultados, a o melhor rendimento de metano foi de 849,23 no ensaio 5 com 18,75 g da combinação de 3,75 g L⁻¹ de GB e 15 g L⁻¹ de DS e com uma relação C/N de 18,06, dos rendimento de biogás os melhores resultados foi com menor concentração de GB (3,75 g L⁻¹) em comparação com os resultados do ensaio 1 do item 5.1.3. Um fato observado foi que, aumentar a concentração da mistura dos resíduos a 12,77 g VS kg⁻¹ e 29,85 g COD L⁻¹ aumenta a produção de biogás, más a concentração de GB de 3,75 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹ de DS da um melhor rendimento de biogás (Figura 5.9). Deve-se notar que, quando a carga de GB aumenta no reator, a probabilidade de acidificação aumenta (pH<6,5), conforme observado nos ensaios 6 (16,86g GB/ 15g DS) e 7 (10,50g GB/ 4,39g DS) o pH foi menor que 6,5 nos primeiros dias de digestão e corrigido para 7,5 com solução de NaOH (0.5 mol L⁻¹). No estudo conduzido por Nghiem *et al.* (2014), observou-se que a adição de mais de 1% de glicerol (substrato único) na digestão anaeróbica tem efeitos negativos, uma vez que o pH diminui rapidamente (pH <6,5) nos primeiros dias de fermentação, com geração de ácidos orgânicos acumulados no meio fermentativo. Portanto, sugere-se a adição de cosubstratos com alto teor de nitrogênio. Neste estudo foi utilizado o DS por ser resíduos com elevado teor de nitrogênio em comparação com o GB (0,00 g L⁻¹), com balanço na relação C/N que beneficia a digestão anaeróbia de resíduos deficientes em nitrogênio.

Figura 5.9. Cinética de produção de metano da codigestão anaeróbia de dejetos suínos e glicerol bruto aos 70 dias de fermentação.



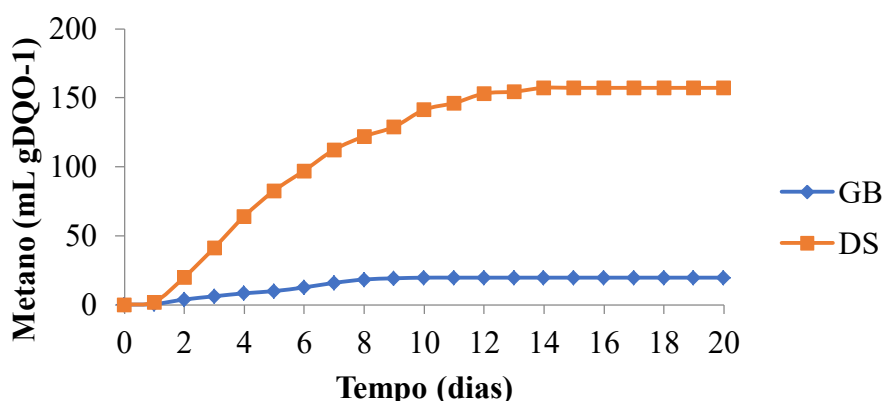
Fonte: Próprio autor.

Por outro lado, o glicerol bruto (100% GB) e dejetos suínos (100% DS) foram avaliados individualmente em digestão anaeróbia para determinar seu potencial para produzir metano. Como ilustrado na Figura 5.10, o tempo de digestão anaeróbia para esses ensaios foi de 20 dias; onde a fase de adaptação foi de aproximadamente 2 dias, uma fase exponencial de 12 dias e finalmente uma fase estacionária e a fase final sem produção de biogás (Figura 5.10). Observou-se que o melhor rendimento de metano foi do DS com 157,17 mL g⁻¹ DQO e um pH final de 6,8. O rendimento de metano do GB foi de 19,60 mL g⁻¹ DQO e o pH final de 5; é provável que esse comportamento seja devido à sua alta concentração de matéria orgânica (1823,12 g de DQO), à ausência de nitrogênio (0,00 g L⁻¹) e impurezas do glicerol bruto, não determinados neste estudo.

Muitos microrganismos podem-se desenvolver dentro de um meio que contém glicerol e usá-lo como substrato na produção de biogás. Entretanto, submeter glicerol à digestão anaeróbia desvia completamente a rota metabólica para a produção de bio- hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos (ácido acético, ácido butírico, ácido valérico, entre outros, como descrito no item 5,3) (SILES *et al.*, 2010). De fato, a digestão anaeróbia do 100% GB não teve sucesso, pois a presença de sais, sabões, metanol e ácidos graxos afetam a atividade microbiana (KOLEŠÁROVÁ *et al.*, 2011). Viana *et al.* (2012) avaliaram a produção de metano de algumas amostras de GB de diferentes fontes, observando que a produção de biogás foi inibida pela composição do resíduo. Esses resultados revelaram que a natureza do óleo, onde o glicerol bruto se

originou, bem como o processo de obtenção do GB, afetou o processo anaeróbio. Siles *et al.* (2010) propuseram a digestão do glicerol bruto com água residual da lavagem do biodiesel. No entanto, a ausência de nitrogênio de ambos os resíduos afetou diretamente o processo anaeróbio, desta forma os autores sugerem cosubstratos complementares, como dejetos animais. Assim, infere-se que a combinação de GB com o DS foi um processo adequado para produzir biogás por codigestão anaeróbica e diminuir o conteúdo de matéria orgânica em termos de DQO.

Figura 5.10. Produção de metano a partir de 100% do GB e 100% do DS na digestão anaeróbica.



Fonte: Próprio autor.

5.2.3 Efeitos da relação GB e DS no desempenho da codigestão anaeróbica

O coeficiente de correlação de Pearson (ρ) foi determinado tomando as variáveis independentes (x), a caracterização inicial da mistura dos resíduos, e as variáveis dependentes (y), foram os valores ao final da codigestão anaeróbica (Tabela 5.9). De acordo com os dados, o grau de relação entre as variáveis e a resposta foi praticamente negativo para a maioria dos resultados. Os resultados estiveram mais próximos de -1, portanto existe uma correlação inversa e uma forte correlação negativa entre a variável/resposta. Os coeficientes próximos de zero (+ ou -), como o observado na variável inicial VS (g kg^{-1}) e a variável amônia (mg L^{-1}), mostram uma fraca correlação com o volume de metano acumulado, é provável que tenha ainda uma relação que não pode ser determinada com o coeficiente de Pearson (ρ), já que a correlação ρ é uma medida lineal entre duas variáveis aleatórias. A correlação positiva ou negativa mais próxima a um (1 ± 1), deste estudo de codigestão anaeróbica da combinação de GB/DS foram cada vez mais próximas a um, observando a dependência da variável resposta das variáveis independentes estudadas.

Tabela 5.9. Correlação de Pearson (ρ) dos parâmetros iniciais (x) e resultados (y) no final da codigestão anaeróbia.

Resposta	DQO _{Inicial} (g kg ⁻¹)	SV _{inicial} (g kg ⁻¹)	SV/ST	Amônia (mg L ⁻¹)
Cumulado (mL)	0,106	0,045	0,142	0,005
Metano (mL gSV ⁻¹)	-0,584	-0,567	-0,294	-0,027
Metano (mL gDQO ⁻¹)	-0,639	-0,569	-0,451	0,245
Conversão (%)	-0,654	-0,569	-0,498	0,279
Amônia final (g L ⁻¹)	0,250	0,492	-0,501	0,789
pH final	-0,296	-0,219	-0,228	0,259

Fonte: Própria do autor.

5.2.4 Efeito do pH e da amônia no processo anaeróbio da mistura de GB/DS

Na Tabela 5.10 ilustra-se os valores iniciais e finais de pH e amônia dos ensaios de produção de metano da codigestão anaeróbia. De acordo com os resultados, o pH inicial de cada ensaio ficou acima de 7,95 e os valores finais estiveram na faixa de 6,33 a 7,56. Esses valores estiveram dentro dos valores de 6,5 a 7,5, sugerido pela literatura como valores ótimos para o desenvolvimento da microbiota anaeróbia (CHEW et al., 2017; SHANMUGAM; HORAN, 2009; XU et al., 2017). Em processos anaeróbios o nitrogênio é fundamental para o sucesso na produção de biogás, já que os micro-organismos precisam de nitrogênio para seu desenvolvimento (CHERNICHARO 2007). Especificamente, as proteínas são degradadas a amônia para ser disponibilizada para o crescimento. Alguns estudos mostraram que a concentração mínima de amônia no reator foi de 150 mg L⁻¹, enquanto a concentração máxima pode ser de 3000 mg L⁻¹, fora dessa faixa pode-se tornar tóxica para os micro-organismos celular (CHERNICHARO, 2007; TIAN et al., 2015; YENIGÜN; DEMIREL, 2013; ZENG et al., 2010).

De acordo com os resultados ilustrados na Tabela 5.10, os valores iniciais de amônia estiveram na faixa de 368 a 2150 mg L⁻¹, dentro da faixa sugerida pela literatura, como apresentado anteriormente. Os ensaios com elevado consumo de amônia foram o ensaio 2 com 87,83%, o ensaio 4 de 75,13%, o ensaio 5 de 72,22% e o ensaio 6 de 78,62%. No entanto, o ensaio 5 foi um dos melhores ensaios na produção de biogás com amônia consumida do 72,22%, com produção de biogás de 849.23 mL g⁻¹ SV. No processo anaeróbio, é provável que a combinação de GB/DS com concentração 18,75 g L⁻¹ foi adequada para um processo eficiente. Um fato observado foi que o ensaio 3 com 15 g L⁻¹ de GB e 7,5 g L⁻¹ de DS, apresentou baixos rendimentos de

consumo de amônia já que a concentração inicial de amônia de 630 mg L⁻¹ e o a concentração final apenas de 200 mg L⁻¹, com 31,7% de amônia consumida no processo.

Sendo assim, os valores finais dos ensaios sugerem que a concentração amônia de todos os ensaios não gerou efeito negativo na produção de biogás. Além de que inúmeros estudos sugerem que o pH e o teor de amônia são parâmetros importantes para o controle preciso da digestão anaeróbica, uma vez que esses valores estão associados diretamente com o rendimento de biogás (BUNDHOO; MOHEE, 2016; WANG *et al.*, 2009; ZENG *et al.*, 2010).

Tabela 5.10. Concentração de amônia e pH no início e no final da codigestão anaeróbia de glicerol residual e dejetos suíno.

Ensaio	pH		Amônia (mg L ⁻¹)		Consumo de amônia (%)
	Inicial	Final	Inicial	Final	
1	8,18±0,08	7,38±0,12	630,00	510,00	19,04
2	8,13±0,19	7,29±0,09	1890,00	230,00	87,30
3	8,56±0,15	6,33±0,11	630,00	200,00	68,25
4	8,52±0,11	7,50±0,00	1890,00	470,00	75,13
5	7,95±0,23	7,26±0,03	1260,00	350,00	72,22
6	8,60±0,04	7,00±0,19	1260,00	420,00	66,66
7	8,43±0,06	7,52±0,14	368,93	260,00	29,53
8	8,31±0,03	7,45±0,05	2150,82	460,00	78,61
9	8,27±0,04	7,56±0,00	1260,00	520,00	58,73

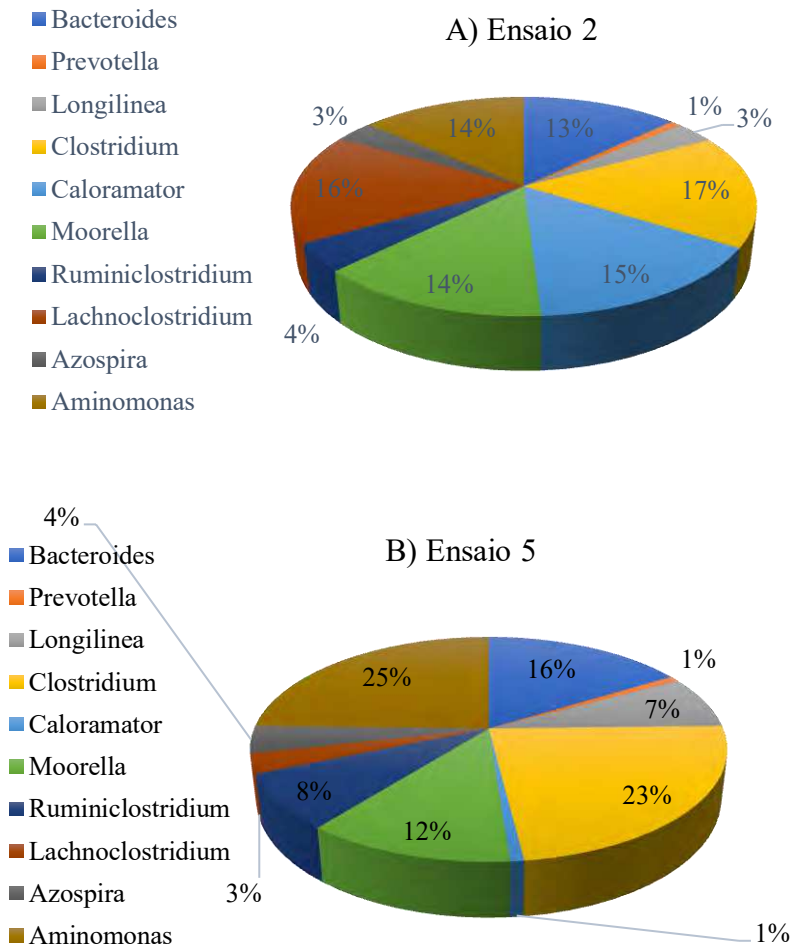
Fonte: Própria do autor.

5.2.5 Aplicação de amostragem das amplicons e perfis taxonômicos

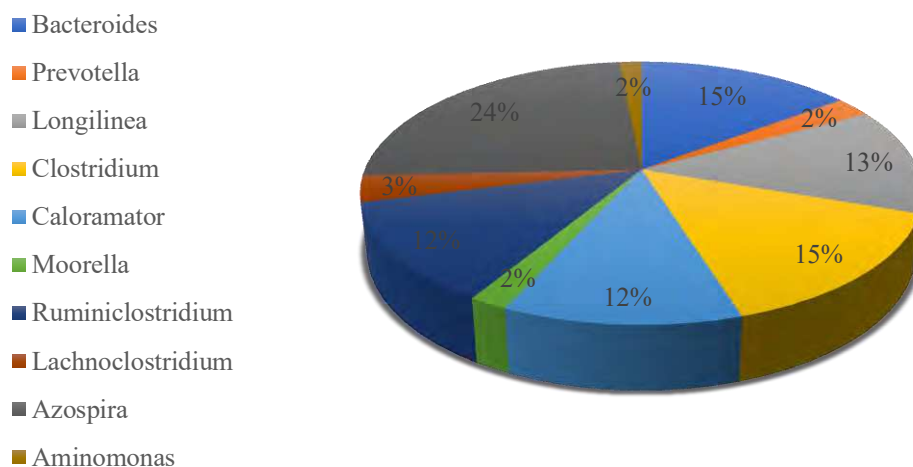
O número total de gêneros observados foi na faixa de 757 a 944, representando mais do que o 80% do máximo de gêneros esperados de acordo com o índice de Chao1 (Figura 5.11), com exceção do ensaio 9 (relação GB/DS de 0,70) que teve 65% de diversidade microbiana. De acordo a Figura 5.11, o índice de Shannon indicou que o ensaio 9 (10,5 GB: 15 DS, Figura 5.11D) apresentou menor diversidade em comparação com o ensaio 2 (6 GB: 22.5 DS, Figura 5.11A), ensaio 5 (3,75 GB: 15 DS, Figura 5.11B) e ensaio 7 (10,5 GB: 4,39 DS) (Figura 5.11, C). A fim de observar diferenças na diversidade entre os ensaios 2, 5, 7 e 9, foi gerada uma matriz de distância com as informações de abundância de classe e gênero (Figura 5.11 e Tabela 5.11). O

consorcio microbiano será diferente para cada sistema uma vez que a concentração de substratos seja diferente, como observado na figura 5.11 os ensaios 2, 5, 7 e 9 mantiveram a diversidade microbiana foi diferente para cada sistema.

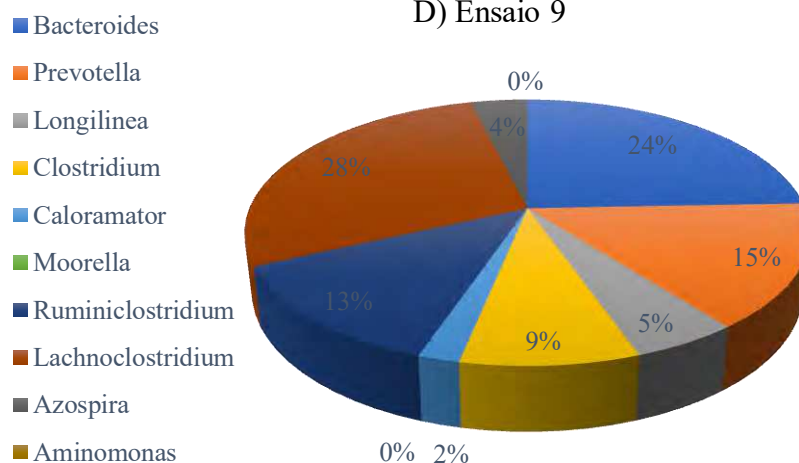
Figura 5.11. Diversidade microbiana dos seguintes ensaios: (A) Ensaio 2 (6 GB: 22.5 DS), B) Ensaio 5 (3,75 GB: 15 DS), C) Ensaio 7 (10,5 GB: 4,39 DS) e D) Ensaio 9 (10,5 GB: 15 DS).



C) Ensaio 7



D) Ensaio 9

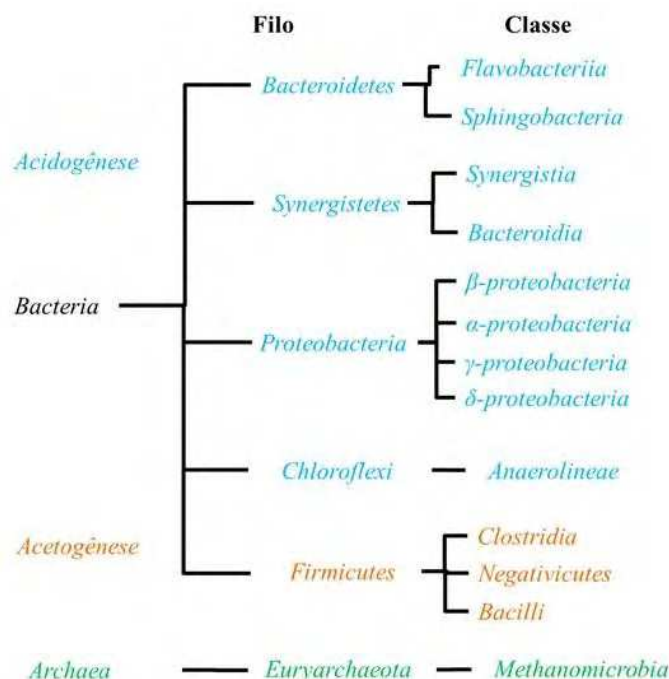


Fonte: Própria do autor.

A classe mais abundante (> 1% de abundância relativa) nos perfis 16S rRNA (Figura 5.11) foram *Clostridia*, *Synergistia*, *Bacteroidia*, *thermotogae*, *Flavobacteriia*, *Betaproteobacteria*, *Anaerolineae* e uma classe não identificada de *Synergistetes*, *Negativicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Methanobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Spirochaetia*, *Alphaproteobacteria*, *Acidimicrobiia*, uma classe não atribuída de *Firmicutes*, *Bacilli*, *Methanomicrobia*, and *Sphingobacteriia* (Figura 5.11). Para todos os ensaios, a classe mais abundante foi a *Clostridia* (na faixa de 26,7-

48,9%) seguida por *Bacteroidia* no caso do ensaio 5 (3,75 GB: 15 DS) com 14,7% e o ensaio 9 (10,5 GB: 15 DS) com 28,4%.

Figura 5.12. Arvore filogenético dos diferentes micro-organismo presentes no processo de co-digestão anaeróbia da combinação de glicerol bruto e dejetos suínos.



Fonte: Próprio autor.

O ensaio 7 (10.5 GB: 4.39 DS) teve uma abundância na classe *Betaproteobacteria* (13,5%), a *Bacteroidia* (11,7%) e a *Anaerolineae* (10,1%). No Ensaio 2 (6 GB: 22,5 DS) a classe mais abundante foi a *Synergistia* (11,3%) e a *Bacteroidia* (9,8%). Em geral, os gêneros mais abundantes (> 5% de abundância) foram a *Clostridium*, *Caloramator*, *Moorella*, *Aminomonas*, *Bacteroides*, *Ruminiclostridium*, *Azospira*, *Longilinea*, *Lachnoclostridium* e *Prevotella* (Figura 12 e Tabela 5.11). Esses gêneros são estritamente anaeróbicos que atuam em sinergia como um consórcio microbiano no microambiente neste estudo. Estes gêneros se apresentam no processo metabólico complementar, segundo alguns estudos, este consórcio participa nos diferentes estádios da digestão anaeróbica. O principal consórcio que atua no estágio hidrolítico é do gênero *Clostridium*, *Bacteroides*, *Aminomonas*, *Longilinea*, *Prevotella* and *Lachnoclostridium* (BAENA *et al.*, 1993; YAMADA *et al.*, 2007), portanto, sugere que o consórcio poderia ter participado no estágio inicial do processo (Figura 5.12). Da mesma forma, no estágio acetanogênico participaram os micro-organismos do gênero

Caloramator e a *Moorella* (Figura 5.12) (RUBIANO-LABRADOR *et al.*, 2013). Finalmente, no es estágio metanogênico os gêneros presentes foram a *Ruminiclostridium*, *Clostridium* e *bacteroides* (Figura 5.12). É importante notar que os gêneros como o *Azospira* tem uma representação importante nesse consórcio, o que sugere uma via anaeróbica adicional, como o metabolismo do nitrogênio (GUO *et al.*, 2018).

Tabela 5.11. Diversidade microbiana apresentada como gênero com menor que 5% de abundância dos Ensaio 2 (6 GB: 22.5 DS), Ensaio 5 (3,75 GB: 15 DS), Ensaio 7 (10,5 GB: 4,39 DS) e Ensaio 9 (10,5 GB: 15 DS).

Filo	Classe	Família	Gênero	Ensaio2 (%)	Ensaio 5 (%)	Ensaio 7 (%)	Ensaio 9 (%)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i>	7,2	4,1	7,7	17,0
		<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	0,5	0,2	1,3	10,5
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>Longilinea</i>	1,8	1,9	6,9	3,6
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	9,3	5,9	7,8	6,0
			<i>Caloramator</i>	8,4	0,2	6,1	1,4
		<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	<i>Moorella</i>	7,6	3,0	1,0	0,0
		<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminiclostridium</i>	2,3	2,0	6,5	9,0
		<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnoclostridium</i>	0,9	0,7	1,7	19,5
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Azospira</i>	1,8	0,1	12,7	2,7
<i>Synergistetes</i>	<i>Synergistia</i>	<i>Synergistaceae</i>	<i>Aminomonas</i>	7,6	6,2	0,8	0,0
Abundância <5%				52,5	75,7	47,6	30,3

Fonte: Próprio autor.

A digestão anaeróbica geralmente requer a aceitação de elétrons, como CO_2 , SO_4^{2-} ou NO_3^- , para o arranjo de elétrons liberados na degradação da matéria orgânica (DANIELS *et al.* 1984). De acordo com o estudo realizado por Hutchison *et al.* (2013), no estudo investigaram o potencial de remoção de perclorato usando *Azospira* (*Dechlorosoma sp.*). Nesse estudo observaram que a capacidade das bactérias redutoras de perclorato foi mais eficiente na presença de nitrato (NO_3^-). Portanto, assumimos que a *Azospira* encontrou as condições apropriadas no Teste 7 (10,5 GB: 4,39 DS) com uma presença relativa de 12,7%, maior em comparação aos Testes 2, 5 e 9 (Tabela 5.12).

Provavelmente no ensaio 5, o nitrogênio não consumido (70,47% de amônia) foi desviado para nitrato e finalmente para a formação de amônia (Tabela 5.11). Neste mesmo sentido, o excesso de amônia no Teste 5.11 resultou em uma baixa produção de metano de 287,13 mL g⁻¹ de DQO adicionada (Tabela 5.5).

5.2.6 Análise da curva de produção de metano utilizando a superfície de resposta

De acordo com o MSR, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,55. A variabilidade dos resultados experimentais em comparação com os resultados obtidos de produção de metano foi de 55,34%. Este fato foi confirmado pelo coeficiente de determinação ajustado R^2 ajustado = 0,18, o que indica que o modelo gerou uma resposta com incerteza. A análise de variância ANOVA mostrou que o modelo de ajuste na produção de metano não teve ajuste suficiente, confirmando que o modelo não foi capaz de representar adequadamente os dados na região experimental estudada. Como ilustrado na Tabela 5.12 e na Figura 5.13, os resultados da análise de variância foram estudados com um nível de significância de 5%. De acordo com a análise de variância (Tabela 5.12 e Figura 5.13), apenas o termo linear e quadrático de GB foram significativos de acordo com o p -valor = 0,35 e p -valor = 0,04, respectivamente. O termo linear dos DS, quadrático de DS e a relação GB/DS não foram significativos com o p -valor > 0,5. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o aumento de GB gera maior inflexão sob a produção de metano, além de que o GB aumenta a concentração de metano tem a desvantagem de aumentar a probabilidade de acidificar o processo anaeróbia, pelo elevado conteúdo de carbono e desbalanço na relação C/N.

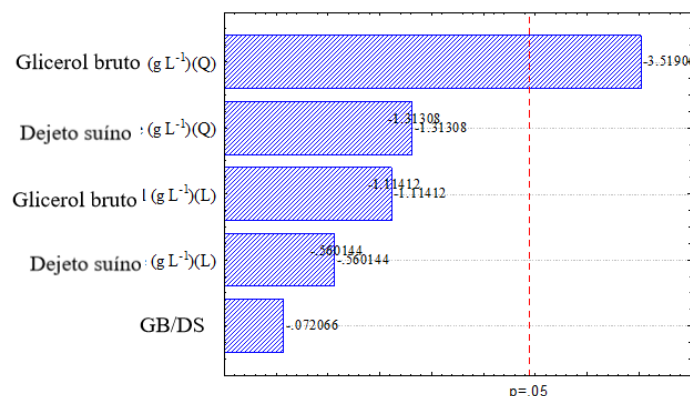
Tabela 5.12. Análise de variância (ANOVA) da porcentagem de metano das diferentes proporções entre GB/DS na codigestão anaeróbia

Fatores	SQ	GL	QM	F	p -valor
GB (L)	35,59	1	35,59	1,013	0,35
GB (Q)	225,79	1	225,79	6,43	0,04
DS (L)	9,68	1	9,68	0,27	0,62
DS(Q)	7,44	1	7,44	0,21	0,66
GB/DS	0,16	1	0,16	0,00	0,95
Erro	210,68	6	35,11		
Total SQ	471,82	11			

SQ soma de quadrados, GL grau liberdade, QM quadrados médios

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.13. Gráfico da Pareto da análise de variância da porcentagem de metano da codigestão anaerobia de diferentes proporções de GB/DS.



Fonte: Próprio autor.

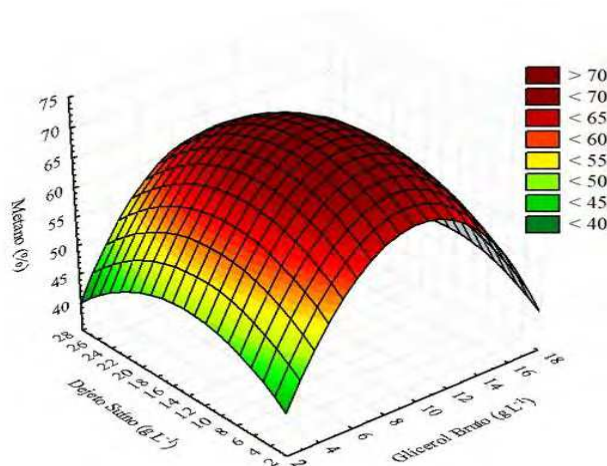
$$\text{Metano (\%)} = 39.43X + 5.51X + 0.49Y - 0.28X^2 - 0.01XY - 0.02Y^2 \quad \text{Equação 5.5}$$

Onde;

X é o glicerol bruto (g L⁻¹)

Y são os dejetos suínos (g L⁻¹)

Figura 5.14. Curva de superfície ajustada da porcentagem de metano de diferentes concentrações de GB e DS após 70 dias de codigestão anaeróbica.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados de metano dos diferentes ensaios são ilustrados no gráfico de superfície de resposta (Figura 5.14). A Figura 5.14 gerada pela Equação 5.5 apresenta o gráfico de superfície de resposta, onde são apresentadas as diferentes concentrações dos fatores (GB e DS) sobre o conteúdo de metano gerado da codigestão anaeróbica. Neste estudo foi observado que a porcentagem mais elevada de metano esteve no ensaio 8 (10,50g GB/25,61g DS) com 71% de metano. Deve-se notar (Figura 5.14) que esta

condição foi dada com 10,50 g L⁻¹ de GB e 25,61 g L⁻¹ de DS; um total da mistura de resíduos de 20,54 g DQO adicionados e uma relação C/N de 20,97 g g⁻¹. No entanto, observou-se que com a elevada concentração de GB o pH do sistema esteve instável (pH<6.5) durante todo o processo de codigestão anaeróbia. Em contraste, como mostrado na Figura 5.14, o ensaio 5 gerou um teor de metano de 61,33%, com 3,75 g L⁻¹ de GB e 15 g L⁻¹ de DS, 18.75 g DQO, que manteve estável o processo anaeróbio. Esses resultados são consistentes, uma vez que a concentração de GB foi menor (3,75g L⁻¹) que a do DS (15g L⁻¹).

Segundo Viana *et al.* 2012 e Fierro *et al.* (2016), mencionam que a elevada concentração de carbono do GB, como observado neste estudo que foi de 88,04% e sua deficiência em nitrogênio (0,00%), portanto, sugere-se o uso do DS como cosubstrato complementar na digestão anaeróbia, pelo conteúdo de nitrogênio. O DS apresenta elevada concentração proteica de 25,55% por grama de resíduo e 4,08% de nitrogênio; confirmando que o DS possui 1890 mg L⁻¹ de amônia; com probabilidade de sucesso do tratamento da combinação do GB/DS, assim sugere-se o uso do ensaio 5 com a combinação de 3,75g GB/15g DS com a relação I/S de 0,89 dentro do sistema anaeróbio.

5.3 Avaliação da produção de bio-hidrogênio a partir de glicose, glicerol bruto e dejetos suínos com três pré-tratamentos.

5.3.1 Caracterização dos substratos e o biogás produzido

Na Tabela 5.13 encontram-se os resultados da caracterização físico-química e elementar do GB, DS e do inóculo. O pH alcalino do GB remete ao processo que lhe deu origem, subproduto da transesterificação de óleo vegetal por catálise homogênea com metóxido de sódio, que resulta em pH extremamente alcalino (10,30). O valor de pH é um importante indicador para avaliar a estabilidade dos sistemas de digestão anaeróbia, pois afeta os micro-organismos acidogênicos e metanogênicos (DENNEHY *et al.*, 2016; GLANPRACHA; ANNACHHATRE, 2016). O valor de sólidos voláteis no GB foi cerca de 80% superior ao contido no DS. O percentual de carbono no GB foi cerca de 40% maior que o determinado para o DS (Tabela 5.13). Por outro lado, não foi encontrada quantidade significativa de nitrogênio no GB (%N <0,05). O percentual de carbono encontrado no GB (88%) não é característico deste efluente que, segundo Thompson; He, (2006), pode variar entre 24 e 38%. Esse excedente de carbono pode indicar a presença de ácidos orgânicos e saponificados não convertidos pelo processo de transesterificação e a presença de ésteres metílicos não recuperados (VALERIO *et al.*, 2015). O dejetos suíno apresentou 25% de proteínas que contribuiriam como fonte de nitrogênio (Tabela 5.13).

Segundo Marone *et al.* (2015) e Dennehy *et al.* (2011) a adição de componentes nutricionais complementares na codigestão de resíduos é um procedimento amplamente aplicado para aumentar a produção de biogás, uma vez que a combinação de diferentes substratos podem fornecer nutrientes equilibrados, reduzir os custos relacionados ao controle do pH e ao balanço da relação C/N, necessários para otimizar o processo de produção de biogás.

Tabela 5.13. Ensaios de produção de hidrogênio usando três tipos de inoculantes: térmico, ácido e básico.

Ensaio	DQO _{Inicial} (g L ⁻¹)	Hidrogênio Térmico (mL g ⁻¹ DQO)	Hidrogênio Ácido (mL g ⁻¹ DQO)	Hidrogênio Básico (mL g ⁻¹ DQO)
1	6,68	72,70	84,65	97,10
2	10,66	108,10	79,52	132,34
3	9,16	170,56	54,31	151,36
4	14,28	46,71	66,47	85,29
5	18,20	93,76	56,18	54,36
6	17,38	74,85	45,82	43,15
7	22,77	59,47	34,84	50,73
8	21,84	81,43	33,68	63,51
9	7,75	53,54	79,23	64,24
10	16,50	95,13	37,81	64,15
11	11,85	93,85	62,47	86,84
12	14,26	131,32	36,09	98,25
13	11,99	107,67	82,76	49,54
14	13,90	125,80	11,69	87,84
15	15,37	77,30	43,83	59,38

ST: sólidos totais, SV: sólidos voláteis

Fonte: Próprio autor.

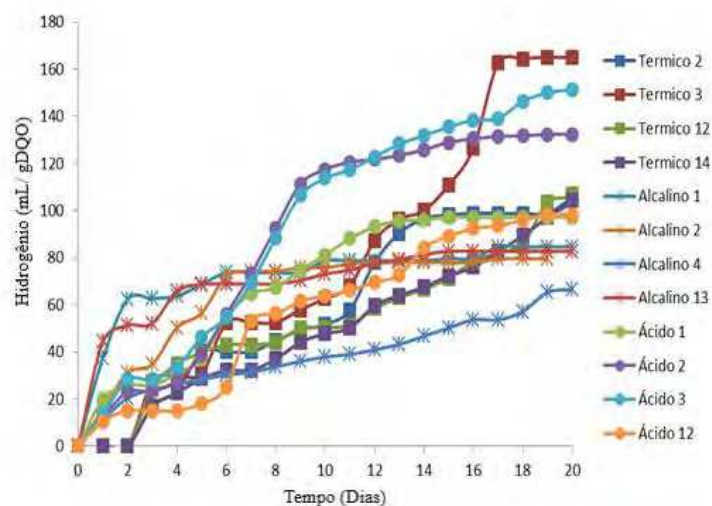
5.3.2 Cinética de produção de hidrogênio

Os melhores resultados de produção de bio-hidrogênio são ilustrados na Figura 5.15, onde foi observado que os rendimentos do hidrogênio variaram na faixa de 60 a 180 mL por grama de DQO adicionados no biorreator. Os dados obtidos permitiram inferir que a produção de hidrogênio por culturas mistas é afetada em função do metabolismo fermentativo das bactérias ali presentes e ainda, de suas interações com os substratos. Nos ensaios com concentrações maiores que 11 gramas de DQO por substrato no reator, da mistura glicose/GB/DS, foi observado um menor rendimento de bio-hidrogênio, inferior a 120 mL por grama de DQO adicionado (Figura 5.15). Contrariamente, no ensaio 3 com inóculo térmico e ácido e concentração de substrato de 9,69 g DQO L⁻¹, foi observada uma maior eficiência na produção de hidrogênio durante o curso de fermentação de 20 dias. Foram observadas curvas de produção de hidrogênio (Figura 5.15) com fase de adaptação dos micro-organismos de 1-3 dias e produção exponencial até o dia 20 aproximadamente.

A fase estacionária foi lenta, com produção de biogás próxima a zero, para todos os ensaios. Nessa fase, os microrganismos foram sensíveis às mudanças no sistema, provavelmente ao pH baixo, menor que 6,5. Este resultado pode ser atribuído à

elevada concentração de ácidos orgânicos (ácido acético e butírico, principalmente) produzido durante a fermentação, afetando o desenvolvimento celular e diminuindo o desempenho do bio-hidrogênio.

Figura 5.15. Cinética de produção de hidrogênio dos melhores ensaios da mistura da glicose, glicerol bruto e dejetos suínos com diferentes tipos inoculantes: térmico, ácido e básico.



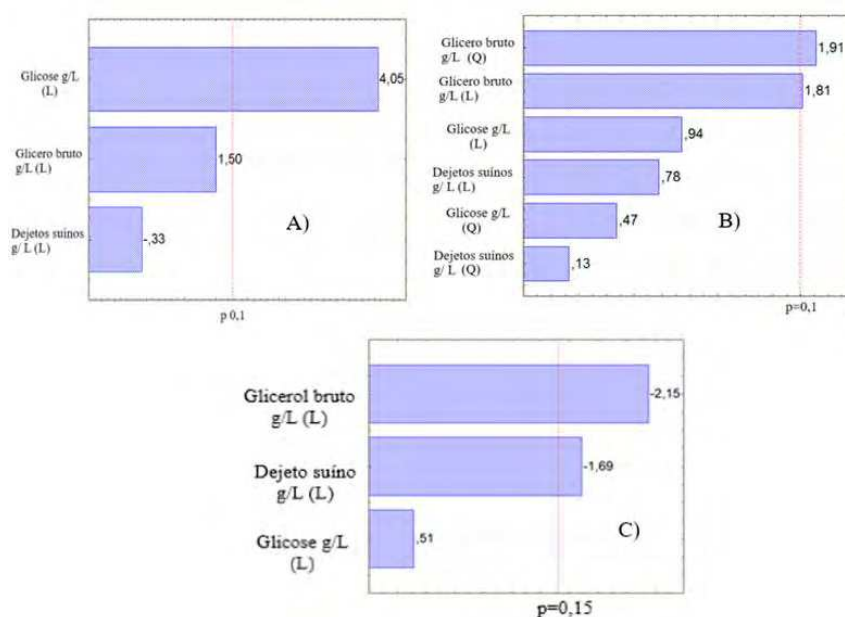
Fonte: Próprio autor.

5.3.3 Análise de variância

A análise de variância ANOVA mostrou que o modelo de ajuste na produção de hidrogênio foi altamente significativo, confirmando assim, que o modelo foi capaz de representar adequadamente os dados na região experimental. Apresentando um efeito significativo na produção de hidrogênio, com nível de significância de 5% (Figura 5.16). Os resultados mostraram que o pré-tratamento do inóculo que resultou em maior produção de gás foi o pré-tratamento térmico (Figura 5.16A). A concentração de glicose apresentou um efeito positivo (p -valor $<0,1$) e as concentrações de glicerol e de dejetos suínos não apresentaram efeito significativo (p -valor $>0,1$) sobre a produção de gás quando o inóculo foi pré-tratado termicamente (Figura 5.16A). Para o inóculo pré-tratado com ácido, o glicerol foi quem apresentou efeito positivo significativo (p -valor $<0,1$) (Figura 5.16B). No inóculo que sofreu pré-tratamento alcalino, o glicerol e o dejetos suínos apresentaram efeito negativo (p -valor $<0,15$) após 8 dias de fermentação e a glicose não apresentou efeito significativo (p -valor $>0,5$) (Figura 5.16C).

Segundo Viana *et al.* (2012) o uso direto do glicerol bruto na digestão anaeróbia, pela alta carga orgânica e pelas elevadas concentração de íons Cl^{-1} , entre 34 e 46g L^{-1} , formados durante a neutralização do glicerol na indústria da produção de biodiesel, inibiriam o crescimento bacteriano afetando diretamente a produção de biogás. Este efeito negativo não foi observado no sistema com inóculo tratado com ácido.

Figura 5.16. Gráfico de Pareto para os efeitos estimados da glicose, glicerol bruto e dejetos suíno após pré-tratamento do inóculo: A) Térmico, B) Ácido e C) alcalino.



Fonte: Próprio autor

5.3.4 Metabolitos solúveis da fermentação escura na produção de hidrogênio com diferentes inocula

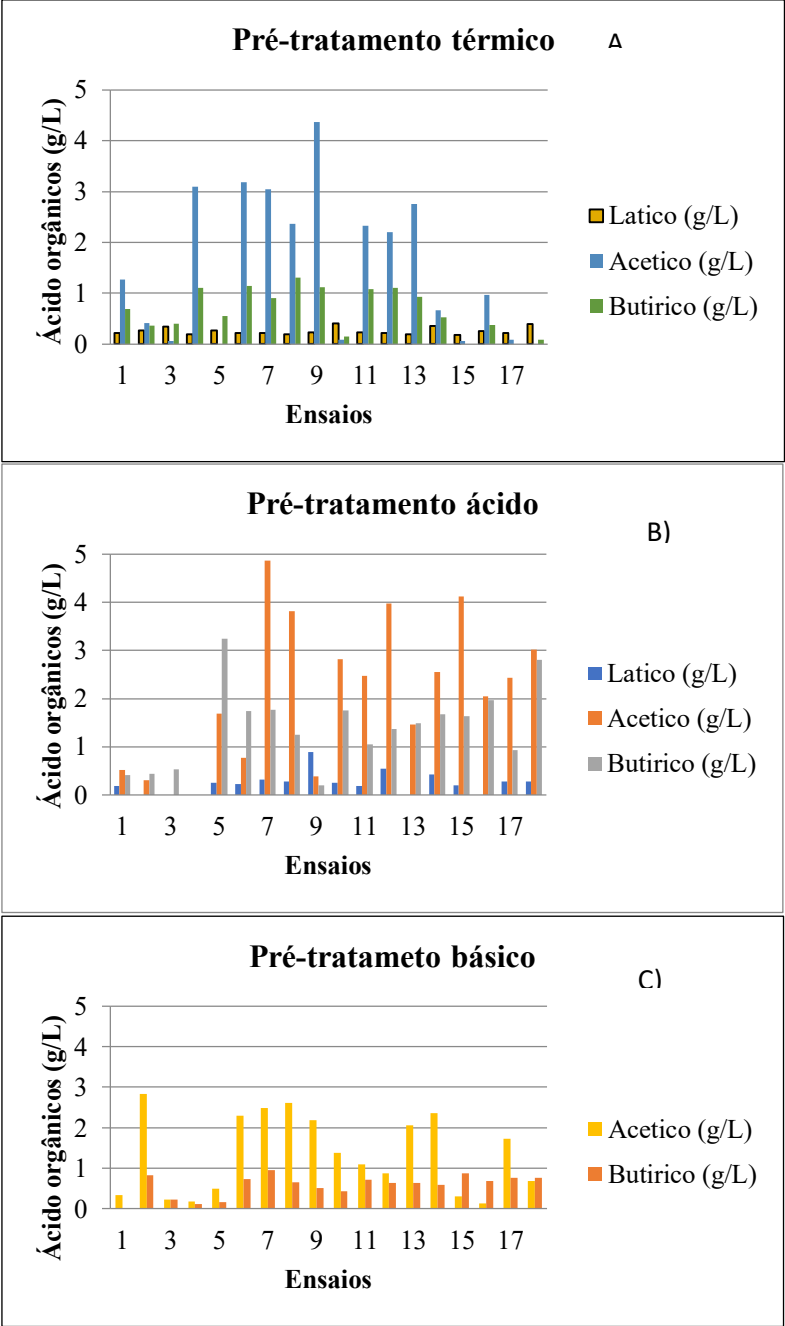
No final da fermentação foi observado que, dependendo do tipo de inóculo e o tipo da combinação dos substratos, tem efeito tanto na produção de hidrogênio como na produção de ácido orgânicos (Figura 5.17). Os resultados evidenciaram que os principais metabolitos achados foram o ácido acético, ácido butírico e ácido lático, indicando que a fermentação foi do tipo misto.

Os ensaios com maior concentração de ácido orgânicos foram com inóculo pré-tratado térmico, principalmente o ácido acético na faixa de 3 a 5 g L^{-1} e o ácido butírico na faixa 0,1 a 2 g L^{-1} , nos ensaios 4, 6-9, 11-13. Todos os ensaios, usando

inóculo ácido, geraram baixa concentração do ácido láctico (menor que 1 g L^{-1}), como observa-se na Figura 5.17A. Por outro lado, os ensaios usando inóculo ácido (Figura 5.17B) geraram maior concentração de ácido acético, nos ensaios 7, 8, 10-12 e 14-18 y maior concentração de ácido butírico nos ensaios 5-18. Da mesma forma, os ensaios com inóculo térmico (Figura 5.17A), foi observada baixa concentração de ácido láctico. Contrariamente, os ensaios com pré-tratamento básico (Figura 5.17C) geraram baixos teores de ácido acético, butírico e láctico. Esse comportamento foi observado nos ensaios 11 e 18, que tiveram concentrações de 14 g L^{-1} e 12 g L^{-1} de ácido láctico. Provavelmente, a rota metabólica (Figura 5.17C) foi desviada completamente para a produção de bio-metano.

Segundo alguns autores (DENNEHY *et al.*, 2016; GLANPRACHA; ANNACHHATRE, 2016) a presença de ácido láctico na digestão anaeróbia indica presença de bactérias metanogênicas no sistema. No entanto, a elevada concentração dos Ácido orgânicos inibiu a produção do biogás. Portanto, alguns autores propõe uma aplicação para estes ácidos orgânicos, gerados na fermentação escura. Uma aplicação viável seria usar os efluentes da fermentação escura como substratos numa segunda etapa de produção de metano. Assim, combinando as duas etapas, a produção de hidrogênio e produção de metano, otimizaria a conversão dos resíduos, produzindo dois tipos de gases e diminuindo a concentração dos efluentes em termos de DQO.

Figura 5.17. Principais ácidos orgânicos gerados na produção de bio-hidrogênio com glicose, glicerol bruto e dejetos suínos, com inóculos submetidos pré-tratamentos: A) Térmico, B) Ácido e C) Básico.



Fonte: Próprio autor.

5.4 Produção de hidrogênio de glicerol bruto e dejetos suínos com pré-tratamento térmico e ácido

5.4.1 Caracterização dos Substratos

No bioprocessos de produção de hidrogênio foi importante conhecer a composição físico-química dos substratos, os quais desempenharam um papel fundamental na produção hidrogênio e na redução do volume de resíduos.

A partir da caracterização físico-química do GB e do DS (Tabela 5.14), foi estabelecida a relação SV/ST (sólidos voláteis / sólidos totais), que representaram a porcentagem da matéria orgânica total de cada resíduo. Os DS mantiveram 83,83% de matéria orgânica e o GB apresentou quase 100% de biodegradabilidade. Labatut *et al.* (2011) demonstraram que a relação SV/ST, uma medida indireta, correlaciona-se com sua biodegradabilidade por micro-organismos durante o processo de fermentação. Nesse sentido, o GB e o DS utilizados em nosso estudo mostram potencial para serem empregados como substratos no processo de fermentação para produção de bio-hidrogênio pelo elevado conteúdo de DQO com 1974,40g para o GB e 137,83g para o DS.

Considerando a relação C/N que é um parâmetro importante por estar relacionado aos níveis de nutrientes necessários em um substrato para micro-organismos anaeróbios, foram observados valores para o GB com relação C/N de 1760,80 e para o DS de 12,14. Uma relação C/N elevada induz uma baixa taxa de solubilidade proteica e leva a baixas concentrações de amônia livre no reator ((ELBESHBISHY *et al.*, 2017) *et al.*, 2019) fatores que afetam o desempenho do micro-organismo no bioprocessos. Conforme relatado por Wang *et al.* (2014), as maiores relações C/N estudadas na digestão anaeróbia estão na faixa de 10 a 35 carbonos a 1 (um) nitrogênio. Portanto, quantidades insuficientes de carbono ou nitrogênio podem limitar o desempenho da fermentação anaeróbica, quando o GB e o DS são usados independentemente (TIAN *et al.*, 2015; VIANA *et al.*, 2012).

Segundo Dennehy *et al.* (2016), a adição de componentes nutricionais complementares à digestão de resíduos é um procedimento amplamente aplicado para aumentar a produção de hidrogênio uma vez que tais componentes podem proporcionar balanço de nutrientes, balanço C/N (carbono / nitrogênio) e custos reduzidos relacionados ao controle do pH, proporcionando uma capacidade tamponante no reator,

necessária para a otimização do processo de produção de hidrogênio. Neste sentido a combinação do GB e DS dos ensaios apresentaram resultados positivos para o balanço da relação C/N do bioprocesso.

Tabela 5.14. Características físicas e químicas do glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS) previamente à produção de hidrogênio

Parâmetros	GB	DS	Inóculo
pH	10,35 ± 0,00	6,513 ± 0,53	6,73 ± 0,15
ST (g L ⁻¹)	870,34 ± 0,00	199,86 ± 0,01	6,77 ± 0,60
SV (g L ⁻¹)	870,09 ± 0,00	167,55 ± 0,01	5,04 ± 0,69
SV/ST (% m m ⁻¹)	99,97	83,83	74,39
DQO (g L ⁻¹)	1974,40	137,83	5,47
DBO (g L ⁻¹)	1934,91	83,41	n/d
DBO/DQO	0,98	0,61	n/d
Carbono (% m m ⁻¹)	88,04	49,62	n/d
Nitrogênio (% m m ⁻¹)	<0,05	4,08	n/d
Oxigênio (% m m ⁻¹)	11,08	6,50	n/d
Proteína (% m m ⁻¹)	<0,05	25,55	n/d
Relação C/N	1760,80	12,14	n/d

n / d: não determinado, TS: Sólidos totais, SV: Sólidos voláteis, DQO: demanda química de oxigênio, DBO: demanda bioquímica de oxigênio, relação C / N (carbono / nitrogênio).

Fonte: Próprio autor.

5.4.2 Seleção de inóculos com pré-tratamentos térmicos e ácidos para produção de hidrogênio

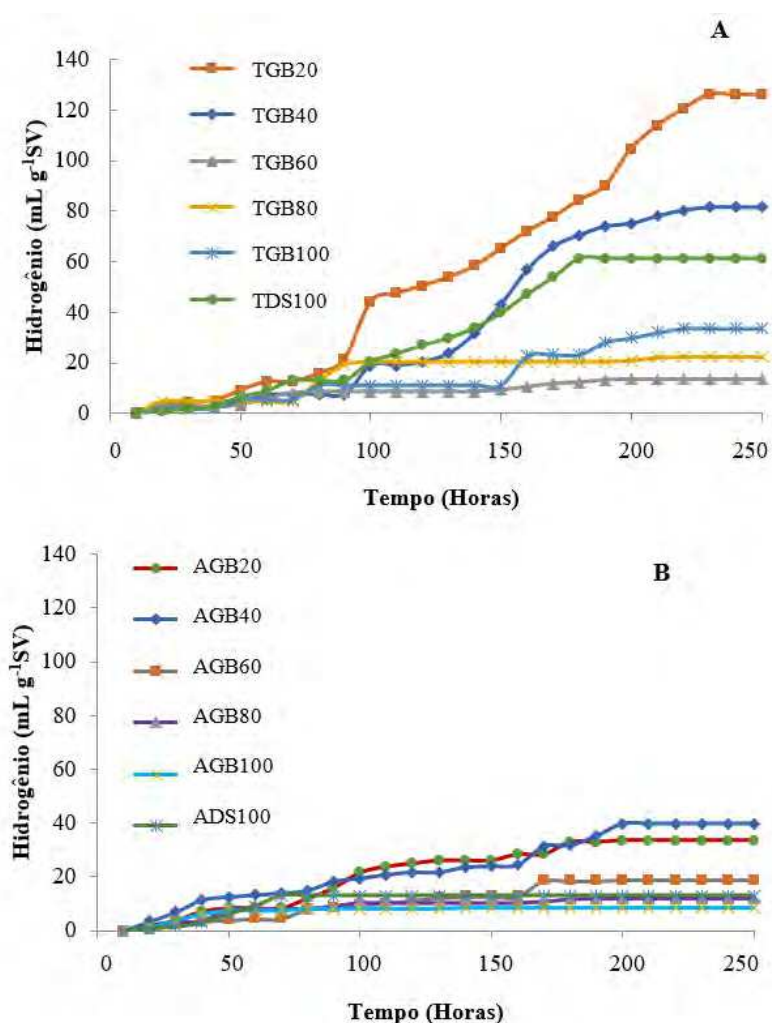
5.4.2.1 Cinética do Rendimento de Hidrogênio

A produção de hidrogênio com inóculo submetido ao pré-tratamento ácido e térmico encontra-se na Figura 5.18, na qual foi observada diferença significativa na produção de hidrogênio em função do tempo de fermentação.

Os ensaios conduzidos com este inóculo, apresentaram uma curva monofásica de produção de hidrogênio em aproximadamente 13 dias de processo, com uma taxa de produção exponencial na faixa de 8 a 10 dias de incubação. Foi observado ainda que os estágios de adaptação dos micro-organismos foram diferentes para cada tratamento. Neste sentido foi observado que para os ensaios inoculados com pré-tratamento térmico (Figura 5.18-I), a adaptação dos micro-organismos exigiu período de 4 dias, ou seja, um tempo mais longo em comparação com os ensaios que foram realizados com inóculos provenientes do pré-tratamento ácido (Figura 5.18-II), que exigiu apenas um dia de adaptação. Possivelmente os ensaios conduzidos com inóculos submetidos ao pré-tratamento térmico (105°C, min e 1 atm) tenham inibido o

crescimento da maioria das bactérias metanogênicas, necessitando assim, de tempos de adaptação mais longos para as bactérias produtoras de hidrogênio. Ainda neste contexto, a conversão do substrato a hidrogênio foi lenta, todavia, o rendimento de hidrogênio foi maior (>50mL) (Tabela 5.15) em comparação com o bioprocesso conduzido com enriquecimento ácido, pois o consumo de substrato início mais rapidamente e terminou em menor tempo.

Figura 5.18. Comparação da cinética de 13 dias (12 horas) de produção de hidrogênio com inóculo submetido ao pré-tratamento térmico (A) e inóculo submetido ao pré-tratamento ácido (B).



Nos ensaios foram adicionadas diferentes concentrações de substratos: GB20 (20% GB: 80% DS), GB40 (40% GB: 60% DS), GB60 (60% GB: 40% DS), GB 80 (80% GB: 20 % DS), GB100 (100% GB), DS100 (100% GB).

Fonte: Próprio autor.

Os melhores resultados de rendimento de hidrogênio foram observados nos ensaios TGB20, TGB40 e TDS100, todos submetidos ao pré-tratamento térmico, com valores de: 126,14 mL g g⁻¹ SV, 81,51 mL g⁻¹ SV e 61,25 mL g⁻¹SV, respectivamente. Os ensaios TGB60, TGB80 e TGB100 conduzidos com inóculos tratados termicamente, bem como todos os ensaios realizados com inóculos enriquecidos com pré-tratamento ácido geraram as menores concentrações de hidrogênio (<50 mL g⁻¹ SV) (Tabela 5.15).

Observou-se que o inóculo com pré-tratamento ácido levou a uma maior produção de hidrogênio e ainda, que, proporcionou uma rápida adaptação destes micro-organismos ao meio, além de um aumento na concentração de ácido orgânicos que interferiu na diminuição de pH < 5. Outro fato observado em todos os ensaios foi que o aumento de carboidratos em forma de GB (>20% de GB) afetou negativamente o processo de fermentação, pois inibiu as bactérias produtoras de hidrogênio, provavelmente pelas impurezas presente no GB (NaOH, Metano, ácidos graxos) (Viana *et al.* 2012).

Os resultados deste estudo concordam com os obtidos pelos autores que fizeram seleções de bactérias produtoras de hidrogênio (DEMIREL; SCHERER, 2008; LI *et al.* 2011; MU *et al.* 2007; REN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2011). No estudo de Wang e Wan (2008) foram comparados cinco métodos de pré-tratamento (ácido, base, térmico, aeração e clorofórmio) na seleção de bactérias produtoras de hidrogênio e estes observaram que os tratamentos inibiram com sucesso o crescimento de bactérias metanogênicas, incluindo metanogênicas hidrogenotróficas e acetoclásticas. Estes autores demonstraram ainda, que, o uso do inóculo com pré-tratamento térmico foi o melhor, pois aumentou a produção de hidrogênio. Ainda, no estudo de Rafieenia *et al.* (2018) a produção de hidrogênio por fermentação escura foi realizada empregando o pré-tratamento térmico na seleção dos micro-organismos produtores de hidrogênio e foi observado que, houve predominância daqueles formadores de esporos dos gêneros *Clostridium spp.* e *Bacillus spp.*. No entanto, as bactérias metanogênicas, que são os principais consumidores de hidrogênio foram inibidas no processo devido serem sensíveis a certas temperaturas.

Tabela 5.15. Produção de hidrogênio com diferentes concentrações de glicerol bruto (GB) e dejetos suíno (DS) com inóculantes submetidos aos pré-tratamentos térmico e ácido

DS (%)	GB (%)	Relação C/N	pH _{inicial}	Hidrogênio (mL g ⁻¹ SV)	
				Pré-tratamento térmico	Pré-tratamento ácido
80	20	16,24	7,38 ± 0,08	^c 126,14 ± 12,3	^a 33,44 ± 10,1
60	40	23,04	7,29 ± 0,20	^d 81,51 ± 9,9	^a 39,75 ± 4,9
40	60	36,48	7,33 ± 0,15	^e 13,38 ± 7,4	^b 18,92 ± 5,6
20	80	75,57	7,50 ± 0,11	^e 22,39 ± 10,2	^b 11,89 ± 3,1
0	100	1760,80	7,26 ± 0,23	^d 33,70 ± 6,98	^b 8,46 ± 4,4
100	0	12,14	7,00 ± 0,04	^d 61,25 ± 15,4	^b 12,94 ± 2,7

Símbolos diferentes (a, b, c, d, e) representam diferenças significativas de acordo com um nível de confiança de 5% na produção de hidrogênio.

Fonte: Próprio autor.

O rendimento de hidrogênio na fermentação escura foi afetado pela relação C/N, pois foi observado que, a baixa concentração da fonte de carbono (<20% de GB) e a elevada concentração de nitrogênio (até 80% de DS) melhoraram o rendimento de hidrogênio. Este fato foi demonstrado no ensaio TGB20 (20%GB/80%DS) e ocorreu devido ao balanço na relação C/N de 16,24 (Figura 5.17 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e Tabela 5.15). Foi observado que a relação C/N melhorou o rendimento de hidrogênio com 126,14 mL g⁻¹ de SV. Em contraste, os ensaios com GB80 (80%GB/20%DS) com relação C/N de 75,57 apresentaram baixo rendimento de hidrogênio com valores de 22,39 mL g⁻¹SV com inóculo pré-tratado termicamente e 11,89 mL g⁻¹ SV com inóculo submetido ao pré-tratamento ácido. Este estudo demonstrou que a elevada concentração de glicerol bruto (> 20% em peso) aumentou a relação C/N e diminuiu a produção de hidrogênio.

5.4.3 Caracterização Físico-química da mistura dos Substratos (GB/DS)

As características físico-químicas dos substratos de forma individualizada estão apresentadas na Tabela 5.14 e a caracterização da mistura dos substratos, GB/DS encontram-se apresentada na Tabela 5.16. Foram observados valores que variam na

faixa de 4,39 a 11,78 g L⁻¹ de ST; 4,08 a 11,45 g L⁻¹ de SV e 6,12 a 19,41 g L⁻¹ de DQO. Enquanto à relação inóculo/substrato (I/S) variou de 0,44 a 1,16 (g g⁻¹).

De acordo com o Labatut *et al.* (2011), a concentração de dejetos adicionado no digestor anaeróbio deve ser superior que 3 g SVL⁻¹ e a relação de I/S mínima deve ser de 0,5, para fins de assegurar o início do processo anaeróbico nas primeiras 36 horas de fermentação. Do mesmo modo, a relação C/N reflete os níveis de nutrientes de um substrato em fermentação, sendo assim, uma relação C/N elevada de 63,63, como apresentado no ensaio 7 (7g L⁻¹ do GB e 2,93 g L⁻¹ do DS), demonstrou baixos rendimentos de hidrogênio na fermentação.

Tabela 5.16. Características físico-químicas dos substratos: glicerol bruto (GB), dejetos suíno (DS) e, GB e DS combinados

Ensaio	Concentração de substratos		DQO (g L ⁻¹)	ST (g L ⁻¹)	SV (g L ⁻¹)	Relação C/N
	Combinados (g L ⁻¹)					
	GB	DS				
1	4,00	5,00	7,17±0,35	4,48±0,13	4,32±0,08	29,37
2	4,00	15,00	8,98±0,79	6,48±0,29	5,99±0,13	17,88
3	10,00	5,00	16,56±0,35	9,70±0,39	9,54±0,37	55,22
4	10,00	15,00	18,37±0,26	11,70±0,80	11,21±0,67	26,50
5	2,75	10,00	6,12±0,18	4,39±0,37	4,07±0,36	18,06
6	11,24	10,00	19,41±0,35	11,78±1,15	11,45±1,07	36,35
7	7,00	2,93	11,49±0,78	6,68±0,70	6,58±0,74	63,63
8	7,00	17,07	14,05±0,10	9,50±1,07	8,95±0,97	20,97
9	7,00	10,00	12,77±0,47	8,09±0,27	7,77±0,27	27,22
10	7,00	10,00	12,77±0,47	8,09±0,27	7,77±0,27	27,22
11	7,00	10,00	12,77±0,47	8,09±0,27	7,77±0,27	27,22
12	7,00	10,00	12,77±0,47	8,09±0,27	7,77±0,27	27,22

GB: Glicerol Bruto, DS: Dejetos Suíno, DQO: Demanda Química de Oxigênio, ST: Sólidos totais, SV: Sólidos Voláteis. I/S: Inóculo/Substrato.

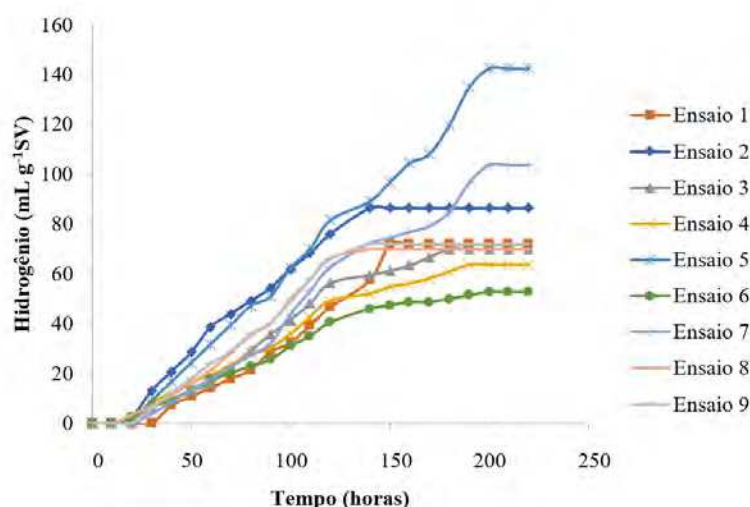
Fonte: Próprio autor.

5.4.4 Produção de bio-hidrogênio usando inóculo com pré-tratamento térmico

Os resultados de produção de bio-hidrogênio são ilustrados na Figura 5.19, onde foi observado que os rendimentos do hidrogênio variaram na faixa de 52,76 a 142,46 mL por grama de SV adicionada no reator. Os dados obtidos permitiram inferir que a produção de hidrogênio por culturas mistas ocorre em função do metabolismo fermentativo das bactérias presentes no sistema e ainda, de suas interações com a cominação do GB/DS.

Nos ensaios 3, 4 e 6, ensaios com concentrações maiores que 9 g SV da combinação dos fatores (GB/DS) no reator, foi observado efeito direto no processo de fermentação, refletindo em um baixo rendimento de bio-hidrogênio, menor que 70 mL por grama de DQO (Figura 5.19). Contrariamente, nos ensaios 2 e 5, com concentração de substrato de 5,99 g DQO e 4,02 g SV, foram observadas as maiores eficiências na produção de hidrogênio com 142,46 mL e 86,36 mL, respectivamente, durante o curso da fermentação em 13 dias. Do mesmo modo, foram observadas (Figura 5.19) curvas de produção de bio-hidrogênio com fase de adaptação dos micro-organismos de um dia e produção exponencial até o 10º dia aproximadamente. Na fase exponencial, a reprodução celular foi extremamente ativa, com maior atividade metabólica com elevada taxa de produção de hidrogênio conforme esperado. A fase estacionária foi lenta, com produção insipiente de hidrogênio para todos os ensaios. Nessa fase, os micro-organismos foram sensíveis a mudanças de pH no sistema, que provavelmente encontravam-se menor que 6,5. Esse comportamento pode ser atribuído à elevada concentração de ácidos orgânicos produzidos no sistema de fermentação, principalmente ácido acético e butírico (Tabela 5.17), afetando o desenvolvimento celular e diminuindo o desempenho da produção de bio-hidrogênio.

Figura 5.19. Perfil dos testes de produção de hidrogênio com 13 dias (12 horas) de fermentação do glicerol bruto e os dejetos suínos.



Ensaio 1 (4,31 g SV L⁻¹); Ensaio 2 (5,99 g SV L⁻¹); Ensaio 3 (9,53 g SV L⁻¹); Ensaio 4 (11,21 g SV L⁻¹); Ensaio 5 (4,07 g SV L⁻¹); Ensaio 6 (11,45 g SV L⁻¹); Ensaio 7 (6,58 g SV L⁻¹); Ensaio 8 (8,95 g SV L⁻¹); Ensaio 9 (7,76 g SV L⁻¹).

Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.17. Parâmetros finais do processo fermentativo, realizados em ensaios com diferentes concentrações de glicerol bruto (GB) e dejetos de suínos (DS).

Ensaio	Concentração de Substratos Combinados (%)		Hidrogênio (mL g ⁻¹ SV)	Hidrogênio acumulado (mL)
	GB	DS		
1	44,44	55,56	71,78±5,90	7,75±0,37
2	21,05	78,95	86,36±9,68	12,94± 0,33
3	66,67	33,33	69,86±9,88	16,66±1,37
4	40,00	60,00	63,57±12,85	17,82±0,55
5	21,56	78,44	142,46±13,24	14,49±0,63
6	52,92	47,08	52,76±4,84	15,11±0,94
7	70,51	29,49	103,61±16,71	17,05±0,91
8	29,08	70,92	69,95±4,97	15,65±0,99
9	41,18	58,82	71,84±4,69	13,95±0,81
10	41,18	58,82	77,82±5,33	15,11±1,04
11	41,18	58,82	72,23±5,05	14,02±0,93
12	41,18	58,82	64,25±5,57	13,89±1,08

GB: glicerol bruto, DS: dejetos de suínos, SV: sólidos voláteis

Fonte: Próprio autor.

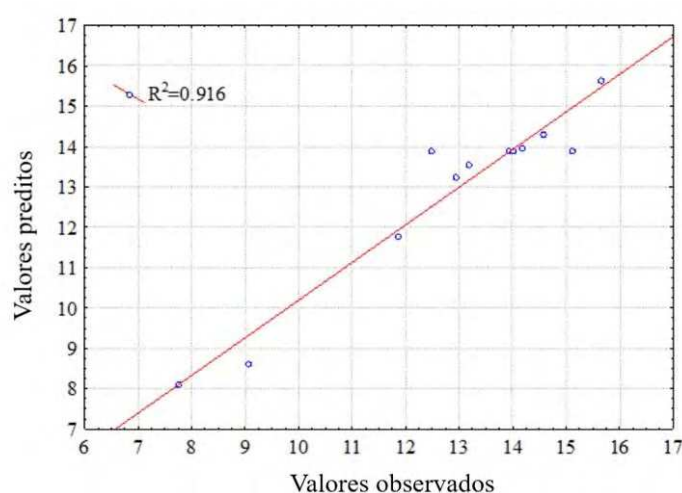
A fase de adaptação da flora microbiana foi de 24 horas e a fase exponencial de produção de hidrogênio foi a partir de 24 horas seguindo até 192 horas, nesta última fase a reprodução celular foi extremamente ativa e com maior atividade metabólica. A fase estacionária foi caracterizada pelo lento consumo dos substratos (5.19) e baixa produção de hidrogênio.

Fernandes *et al.* (2010) estudou a produção de hidrogênio utilizando quatro diferentes substratos, sendo: a partir de glicerol bruto produzindo 200 mL g⁻¹ DQO; utilizando esgoto doméstico com produção de 200 mL g⁻¹ DQO, empregando vinhaça com gerando produção de 579 mL g⁻¹ DQO e, a partir da sacarose produzindo 200 mL g⁻¹ DQO sendo todos os processos submetidos a correção do pH para 6,5 com agentes químicos, como o bicarbonato de sódio. Em nosso estudo, a mistura de resíduos utilizada gerou melhores resultados do que aqueles conduzidos de forma individualizada com 2,75 g L⁻¹ do GB e 10 g L⁻¹ do DS (Tabela 5.17) e sem a realização de correção do pH, pois o uso de agentes químicos, podem gerar custos extras na produção de hidrogênio.

5.4.5 Análise da curva de superfície de resposta na produção de hidrogênio

Na Figura 5.20 apresenta-se a curva R² com coeficiente de determinação de 0,916. O coeficiente apresentou a variabilidade de 91,6% da variável de resposta (bio-hidrogênio). Esse fato foi confirmado pelo valor de coeficiente de determinação ajustado (R² adj.=0,864), que indica que o modelo gerou uma resposta positiva a partir dos dados experimentais.

Figura 5.20. Predição de R² usando a metodologia de superfície de resposta (MSR).



Fonte: Próprio autor.

A análise de variância ANOVA apontou que o modelo de ajuste na produção de bio-hidrogênio foi altamente significativo, confirmando assim, que o modelo foi capaz de representar adequadamente os dados na região experimental. Foi

observado que houve um efeito significativo na produção de bio-hidrogênio (variável dependente), com nível de significância de 5% (Tabela 5.18 e Figura 5.21). De acordo com a análise estatística sobre a produção de bio-hidrogênio, pode-se afirmar que o termo linear do DS e o GB foram significativos de acordo com o p -valor=0,003 e 0,01, respectivamente. Contrariamente ao termo quadrático do DS que não foi significativo com p -valor=0,63, para o nível de significância adotado de 5%. Ainda, foi observado que o valor do efeito quadrático do fator glicerol bruto (GB) foi positivo com o p -valor de 0,004, indicando que o seu aumento influenciou no aumento de volume de bio-hidrogênio. Também, a mistura do GB/DS teve efeito positivo com valor de 0,035, a mistura dos substratos teve efeito positivo sobre a produção do hidrogênio.

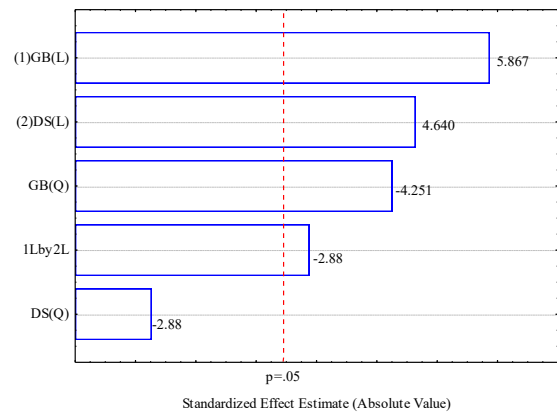
Tabela 5.18. Análise de variância (ANOVA) do modelo aplicando a metodologia de superfície de resposta (MSR)

Fatores	SQ	GL	QM	F	p-valor
GB (L)	28,95	1,00	28,95	23,93	0,003
GB (Q)	24,08	1,00	24,08	19,90	0,004
DS (L)	16,98	1,00	16,98	14,03	0,010
DS(Q)	0,25	1,00	0,25	0,21	0,663
GB / DS	8,89	1,00	8,89	7,35	0,035
Error	7,26	6,00	1,21	-	-
Total SS	86,55	11,00	-	-	-

SQ: Soma de Quadrados, GL: Grau de liberdade, QM: Quadrados médios,
Nível de significância: $P > 0,05$ é considerado estatisticamente insignificante.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.21. Gráfico de Pareto da metodologia de superfície de resposta (MSR), dos resíduos (GB e DS) e a produção de hidrogênio como resposta.



Fonte: Próprio autor.

Na análise do gráfico de superfície de resposta gerado a partir da Equação 5.6 (Figura 5.22A) e Equação 5.7 (Figura 5.22B), foi possível observar os efeitos positivos dos fatores GB e DS na produção de hidrogênio.

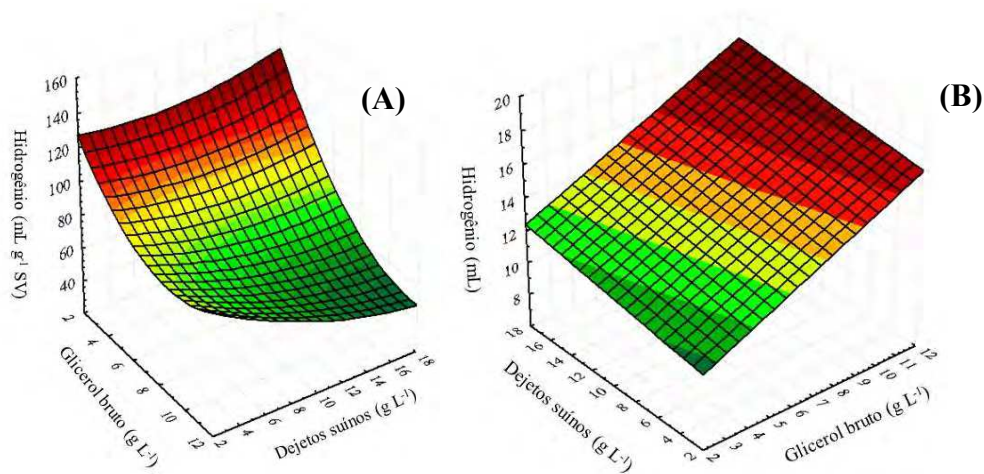
$$Hidrog\hat{e}nio = 157,19 - 15,63X - 0,79Y + 0,91X^2 - 0,35XY + 0,11Y^2$$

Equação 5.6

$$Hidrog\hat{e}nio\ acumulado = 9,17 + 0,61X + 0,11Y$$

Equação 5.7

Figura 5.22. Resultados do hidrogênio acumulado, aplicando a metodologia de superfície de resposta (MSR). (A) O rendimento de produção de hidrogênio por grama de sólido volátil; (B) produtividade acumulada de hidrogênio, em relação à mistura de glicerina bruta e dejetos suínos.



Fonte: Próprio autor.

A superfície de resposta tridimensional exibida na Figura 5.22 foi construída com base na Equação 5.6 e Equação 5.7 mostrando a influência das variáveis sobre a produção de hidrogênio. Como previsto pelo modelo, foi possível observar que os melhores rendimentos de hidrogênio foram 142,46 mL por grama de sólidos voláteis adicionados. Esses resultados foram obtidos quando o fator GB foi utilizado, com 2,75 g L⁻¹ e um fator DS com 10 g L⁻¹. Um fato observado foi que a maior produção de hidrogênio apresentou valores no limite superior do gráfico (Figura 5.22), na concentração do fator DS, indicando a necessidade de avaliar uma faixa ainda superior com maior amplitude.

Uma elevada relação C/N apresentada pelo GB (1760,80 g g⁻¹), levou ao consumo mais rápido de carbono pelos micro-organismos, causando menor produção de hidrogênio e aumento da concentração de ácido orgânicos no meio fermentativo (Tabela 5.17). Do mesmo modo, foi observado nos ensaios TGB100 e AGB100 que o uso individualizado dos substratos gerou baixos rendimentos de hidrogênio com 33,70 e 8,46 mL g⁻¹ de SV, respectivamente (Tabela 5.17). Foi observado ainda, que ocorreu uma baixa relação C/N (12,14 g g⁻¹), no substrato DS e elevada relação C/N de 1760,80 no substrato GB quando avaliados de forma individualizada. Este fato implica na inibição do crescimento dos micro-organismos fermentadores, sendo assim, indicativo de que o uso combinado desses substratos é positivo para a produção de hidrogênio, pois quando combinado a relação C/N torna-se favorável ao bioprocessamento.

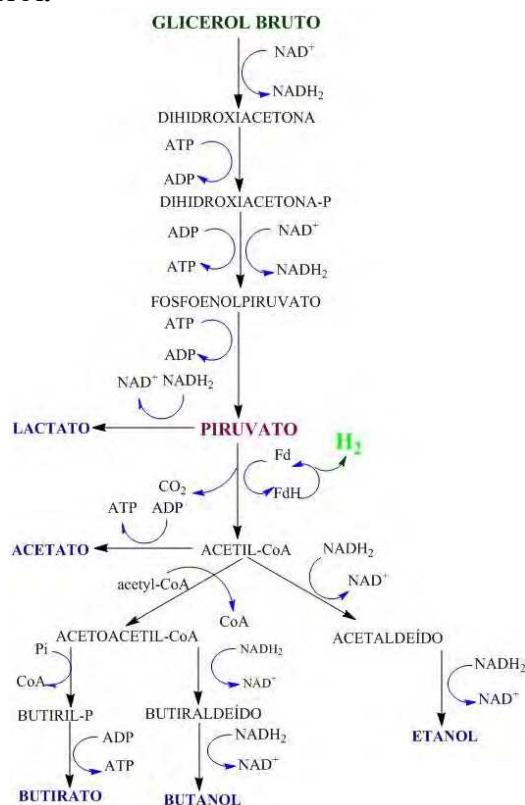
Na 5.23A e na Tabela 5.17, o rendimento máximo de hidrogênio acumulado foi de 17,82 mL no ensaio 6 (40% GB: 60% DS) ao longo de 12 dias de fermentação. No entanto, a elevada carga orgânica de 11,78 g de SV (21,24 g L⁻¹ da mistura dos resíduos), a elevada concentração de 36,35 da relação C/N e a elevada concentração de 11,24 g L⁻¹ do GB afetaram a produção de hidrogênio com 52,76 mL g⁻¹ de SV (Figura 5.23B). Por outro lado, na Figura 5.23 A, no ensaio 5 o hidrogênio acumulado foi de 14,49 mL, e o rendimento de hidrogênio foi de 142,46 mL g⁻¹ de SV adicionado (Figura 5.23B), usando uma mistura de GB/DS de 12,75 g L⁻¹ com 21,56% (2,75 g L⁻¹) de GB e 78,44% (10 g L⁻¹) de DS, com uma relação C/N de 18,06. O ensaio 5 foi o melhor, pois apresentou um dos melhores rendimentos dos ensaios de fermentação, sem a adição de um agente químico para regular o pH. O baixo rendimento de hidrogênio de 52,76 mL g⁻¹ de SV do ensaio 6 está associado a elevada relação C/N do ensaio 6 (36,35 da relação C/N) e a concentração dos resíduos de 4,39 g de SV. Ainda, foi

observado que a elevada concentração de GB ($> 21,56\%$), teve um efeito negativo no rendimento de hidrogênio. Da mesma forma, os resultados deste estudo mostraram que os melhores resultados concordam com estudos que relatam que uma relação C/N está ótima na faixa de 15 a 35 da relação (HU et al., 2011; LIU et al., 2013b; MAO et al., 2015).

5.4.6 Metabolitos solúveis da fermentação escura na produção de hidrogênio com inóculo tratado termicamente

Os principais metabolitos presentes nos ensaios de fermentação detectados foram: o ácido acético e o ácido butírico e, em menor concentração, o ácido succínico. Cabe ressaltar que a concentração de ácido acético não diferiu entre todos os ensaios de fermentação, apresentando uma concentração média de $48,66 \text{ g L}^{-1}$. Os dados obtidos estão de acordo com os resultados relatados no estudo de Mu *et al.* (2007). O trabalho de Mu *et al.* reportaram que nos processos de fermentação escura com inóculo anaeróbio, são gerados ácidos orgânicos como o ácido acético, butírico e succínico. É provável que, esses metabolitos tenham sido produzidos por bactérias do gênero *Clostridium*, entre estas as espécies *C. butyricum*, *C. pasteurianum* ou *Butyrivibrio fibrisolvens*, descritas como as principais espécies encontradas nos processos de fermentação escura (CIBIS *et al.*, 2016; CIBIS; GNEIPEL; KÖNIG, 2016). Cabe ressaltar que, o ácido butírico pode ter sido produzido pela conversão de outros ácidos orgânicos que podem ser intermediários ou produtos finais dos passos anteriores à fermentação (CIBIS *et al.*, 2016). O metabolismo oxidativo do glicerol tem como produto intermediário o piruvato, o qual durante a conversão do glicerol pode ter diferentes rotas, isto depende dos micro-organismos presente no reator, gerando como produto final etanol, butanol, acetona, acetato, butirato e lactato, como ilustrado na Figura 5.23. (DA SILVA; MACK; CONTIERO, 2009; GHIMIRE et al., 2015a; SARMA et al., 2012).

Figura 5.23. Produção de bio-hidrogênio e ácido orgânicos, por diferentes micro-organismos a partir do glicerol.



Fonte: Adotado de DROŹDŹYŃSKA *et al.*, (2011).

O pH dos ensaios foi um indicador importante do processo fermentativo, já que desempenha um papel fundamental nas vias metabólicas da produção de hidrogênio. A elevada concentração de ácido orgânicos reduz o pH no reator, com pH menor que 5,29 afetando negativamente à atividade das enzimas hidrogenase e nitrogenase, responsáveis pela produção de bio-hidrogênio (Tabela 5.19). De acordo com Chandrasekhar *et al.* (2015), a produção de hidrogênio tem um pH ótimo na faixa de 6,0 e 6,5, pois menor que 6,0 afeta o desenvolvimento da microbiota pela concentração de ácido orgânicos, diminuindo a produção de bio-hidrogênio. O baixo rendimento de bio-hidrogênio, causado pelo acúmulo desses ácidos orgânicos, pode ser resolvido usando um segundo reator com bactérias acetogênicas e metanogênicas, através de um sistema de dois estágios. Pois, este sistema proporciona oportunidade para valorizar os efluentes (ácido orgânicos) da fermentação escura, pois estes podem utilizados como substratos no processo de digestão anaeróbia para produzir hidrogênio (metano) (HALLENBECK, P. C. AND BENEMANN, 2012). Carrillo-Reyes; *et al.* (2016) mencionam que, em alguns processos fermentativos para produção de bio-

hidrogênio os carboidratos do GB são os primeiros em serem consumidos, formando ácido orgânicos, tornando assim, o pH <6, com baixa produção de hidrogênio. No entanto, como observado neste estudo o problema pode ser resolvido com o uso associado dos substratos, pois o uso do DS como GB, podem balancear a relação C/N e assim, melhorar a estabilidade da fermentação. Não obstante, a produção de hidrogênio está ligada à geração de ácido orgânicos. Guwy *et al.* (2011) sugerem que os ácidos orgânicos da produção de hidrogênio podem ser utilizados como substratos na integração de um sistema bioeletroquímico, tais como células de combustível microbiana e/ou eletrolise microbiana, associados com o sistema de produção de hidrogênio por fermentação escura. Estes autores reportaram ainda, que esta estratégia possibilita melhores rendimentos em bio-hidrogênio, gerando até 12 mols de H₂ por mol de hexose.

Na Tabela 5.19 foi possível observar o efeito da concentração do glicerol nos ensaios de fermentação. Pois, os resultados sugerem que quanto maior a adição do glicerol, menor será o rendimento em bio-hidrogênio. Este fato pode ser atribuído à sobrecarga de matéria orgânica proveniente do GB (1974 gDQO L⁻¹). Viana *et al.* (2012) relataram que a utilização direta de GB, com elevado teor de DQO, pode afetar o desempenho do consórcio bacteriano, ocasionado pela sobrecarga de carbono e carência de nitrogênio.

Baseado nos dados obtidos no presente estudo foi possível afirmar que o uso da combinação dos substratos orgânicos GB/DS se constitui em uma alternativa viável para a produção de hidrogênio e ácidos orgânicos a partir da fermentação escura gerando melhores resultados do que aqueles provenientes de processos fermentativos com uso de substratos independentes.

Tabela 5.19. Resultados dos ensaios experimentais da produção de bio-hidrogênio da mistura de GB/DS, obtendo respostas como os ácido orgânicos, produção acumulada de hidrogênio e pH final

Ensaio	GB (g L ⁻¹)	DS (g L ⁻¹)	AA (g L ⁻¹)	AB (g L ⁻¹)	AP (g L ⁻¹)	pH final
1	4,00	5,00	48,69	0,00	0,00	5,17
2	4,00	15,00	48,70	0,00	0,08	5,17
3	10,00	5,00	0,00	0,00	0,00	5,89
4	10,00	15,00	48,69	0,00	0,10	5,92
5	2,75	10,00	48,68	0,00	0,07	5,88
6	11,24	10,00	48,70	68,15	0,05	4,77
7	7,00	2,93	48,69	0,00	0,00	5,89
8	7,00	17,07	48,67	68,08	0,07	5,14
9	7,00	10,00	48,67	0,00	0,03	4,93
10	7,00	10,00	48,67	68,15	0,05	4,72
11	7,00	10,00	48,67	68,10	0,03	5,02
12	7,00	10,00	48,67	0,00	0,03	5,03

GB: Glicerol Bruto, DS: Dejeito Suíno; AA: Ácido Acético; AB: Ácido Butírico; AP: Ácido propiônico.

Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÕES

6.1 Conclusões da produção de biogás

- A mistura dos dois efluentes assegurou um adequado tamponamento do meio sem mais intervenção.
- A relação entre a quantidade total de SV do inóculo e a quantidade total de sólidos voláteis da combinação dos efluentes parece ser um fator significativo para a eficiência da biodigestão.
- As condições ótimas para melhorar o rendimento de metano foram as concentrações de GB com $3,75 \text{ g L}^{-1}$ e de DS com 10 g L^{-1} resultando em produção de biogás de $849,23 \text{ mL g}^{-1} \text{ SV}$.
- O aumento da concentração de glicerol bruto acima de 4 g/L teve efeito inibitório para o processo de codigestão anaeróbia na produção de biogás.
- O consórcio bacteriano apresentou modificação populacional nas diferentes concentrações de glicerol bruto e dejetos suínos, e teve efeito na produção de biogás e gás metano.

6.2 Conclusões da produção de hidrogênio

- Os melhores resultados foram obtidos com o inóculo com o pré-tratamento térmico em comparação com o pré-tratamento ácido e básico.
- O melhor rendimento de bio-hidrogênio foi na combinação de $2,75 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol bruto e 10 g L^{-1} de dejetos suínos com produção de $142,46 \text{ mL g}^{-1} \text{ SV}$.
- Os principais ácidos orgânicos gerados na fermentação escura foram o ácido acético e ácido butírico, os quais podem ser purificados, utilizados na produção de biogás (metano) por digestão anaeróbia, produção de hidrogênio por foto-fermentação ou ser utilizados em outros bioprocessos.
- O aumento da concentração de glicerol bruto acima de 4 g/L teve efeito inibitório para o processo de produção de hidrogênio.

6.3 Conclusões gerais

A aplicação da ferramenta de planejamento experimental contribuiu efetivamente no entendimento na interação entre o glicerol bruto e os dejetos suínos no processo de codigestão anaeróbia e fermentação escura, conforme confirmado pelos

elevados níveis de significância determinados a partir do planejamento composto central.

Os resultados demonstram que os dejetos suínos e glicerol bruto se constituem em substratos adequados para o processo de produção de biogás e na produção de hidrogênio, apresentando uma sinergia entre os resíduos e o inóculo em ambos processos.

Neste estudo foi possível observar que o uso combinado do glicerol bruto e dejetos suínos se constitui em uma alternativa interessante para a produção de biogás, hidrogênio e ácidos orgânicos, do que aqueles conduzidos com substratos adicionados de forma individualizados.

O uso combinado dos substratos indica uma diminuição nos custos de produção, pois não há necessidade de correção do pH do bioprocessamento e ainda, se constitui em uma técnica acessível e prática.

O uso do glicerol bruto e os dejetos suínos como substrato na produção de biogás e bio-hidrogênio agregam valor a estes resíduos contribuindo de forma positiva para conservação do meio ambiente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTIN, J.; Venturini, J.; Silva, E.; Aparecida, M.; Calle, O. Aterros sanitários para geração de energia elétrica a partir da produção de biogás no Brasil: comparação dos modelos LandGEM (EPA) e Biogás (Cetesb) *. p. 175–188, 2016.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA)**. 21. ed. Washington, DC: 21st ed. American Water Environment Federation, 1995.

AQUINO, F.S., CHERNICHARO C.A.L. FORESTI E.FLORÊNCIO M.L.S., MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da Atividade Metanogênica Específica (AME) em Lodos Anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.

ARIMI, M.; KNODEL, J.; KIPROP, A.; NAMANGO, S.; ZHANG, Y.; SVEN UWE, G. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 75, n. 0, p. 101–118, 2015.

ASTALS, S. et al. Co-digestion of pig manure and glycerine: Experimental and modelling study. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1091–1096, 2011.

ASTALS, S. ARISO, M.; GAL, A.; MATA-ALVAREZ, J. Co-digestion of pig manure and glycerine: Experimental and modelling study. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 4, p. 1091–1096, 2011.

ASTALS, S.; NOLLA-ARDEVOL, V.; MATA-ALVAREZ, J. Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: Biogas and digestate. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 63–70, 2012.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 62, p. 73–78, 2014.

AZWAR, M. Y.; HUSSAIN, M. A.; ABDUL-WAHAB, A. K. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 158–173, 2014.

BAENA, S.; FARDEAU, M.; OLLIVIER, M.; BALAT, M.; THOMAS, P.; GARCÍA, L.; PATEL, C. *Aminomonas paucivorans* gen. nov., sp. nov., a mesophilic, anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 1999, 1993.

BALAT, M. Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 15, p. 4013–4029, 2008.

BASAK, N.; DAS, D. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 31–42, 2007.

- BESZÉDES, S.; ÁBEL, M.; LÁSZLÓ, Z.; SZABÓ, G.; HODÚR, C. Application of response surface methodology to optimize microwave sludge conditioning for enhanced biogas production. **International Journal of Engineering**, v. 9, p. 189–193, 2011.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S. ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.
- BHARATHIRAJA, B. et al. Biohydrogen and Biogas – An overview on feedstocks and enhancement process. **Fuel**, v. 185, p. 810–828, 2016.
- BOUALLAGUI, H.; LAHDHEB, H.; BEN ROMDAN, E.; RACHDI, B.; HAMDI, M. Improvement of fruit and vegetable waste anaerobic digestion performance and stability with co-substrates addition. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 5, p. 1844–1849, 2009.
- BRENTNER, L. B.; PECCIA, J.; ZIMMERMAN, J. Challenges in Developing Biohydrogen as a Sustainable Energy Source: Implications for a Research Agenda. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 7, p. 2243–2254, 2010.
- BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 16, p. 6713–6733, 2016.
- BUNDHOO, M. A. Z.; MOHEE, R.; HASSAN, M. A. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 157, p. 20–48, 2015.
- CANCELIER, A. SOTO, U.; COSTELLI, M.; LOPES, T.; SILVA, A. Avaliação da produção de biogás de dejetos de suínos utilizando a metodologia de superfície de resposta. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 20, n. 2, p. 209–217, 2015.
- CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHARO. **Biological Wastewater Treatment Vol.4: Anaerobic Reactors**. [s.l.] IWA Publishing, 2007. v. 04
- CARRILLO-REYES, J.; BUITRÓN, G. Biohydrogen and methane production via a two-step process using an acid pretreated native microalgae consortium. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 324–330, 2016.
- CENTRAL STATISTICS OFFICE. *Energy Statistics*. 2017.
- CEZAR, R.; LEITE, D. C. O biocombustível no brasil. p. 15–21, 1970.
- CHANDRASEKHAR, K.; LEE, Y.-J.; LEE, D.-W. Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8266–8293, 2015.
- CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, 2008.
- CHEW, K. W.; SAHU, A.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 135, n. September 2016, p. 403–412, 2017.

- CHU, C. F. LI, Y.; XU, K.; EBIE, Y.; INAMORI, Y. KONG, H. A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 18, p. 4739–4746, 2008.
- CIBIS, K. G.; GNEIPEL, A.; KÖNIG, H. Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. **Journal of Biotechnology**, v. 220, p. 51–63, 2016.
- DA CONCEIÇÃO, L. R. V. CARNEIRO, L. M.; RIVALDI, J. D.; DE CASTRO, H. F. Solid acid as catalyst for biodiesel production via simultaneous esterification and transesterification of macaw palm oil. *Industrial Crops and Products*, v. 89, p. 416–424, 2016.
- DA SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 30–39, 2009.
- DANIELS, L.; SPARLING, R.; SPROTT, G. D. The bioenergetics of methanogenesis. **BBA Reviews On Bioenergetics**, v. 768, n. 2, p. 113–163, 1984.
- DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 21, p. 6046–6057, 2008.
- DE GIOANNIS, G. MUNTONI, A.; POLETTINI, A.; POMI, R. A review of dark fermentative hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Management*, v. 33, n. 6, p. 1345–1361, 2013.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 1, p. 14–34, 2009.
- DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 173–190, 2008.
- DENNEHY, C. LAWLOR, P. G.; CROIZE, T.; JIANG, Y.; MORRISON, L.; GARDINER, G. E.; ZHAN, X. Synergism and effect of high initial volatile fatty acid concentrations during food waste and pig manure anaerobic co-digestion. *Waste Management*, v. 56, p. 173–180, 2016.
- DONG, L. ZHENHONG, Y.; YONGMING, S.; LONGLONG, M. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 2, p. 812–820, 2009.
- DONG, L. ZHENHONG, Y.; YONGMING, S.; XIAOYING, K.; YU, Z. Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, n. 15, p. 8234–8240, 2010.
- DROZDYŃSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *Biotechnologia*, v. 92, n. 1, p. 92–100, 2011.
- ELBESHBISHY, E. HAFEZ, H.; DHAR, B.R.; NAKHLA, G. Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 17, p. 11379–11387, 2011.
- ELBESHBISHY, E. HAFEZ, H.; DHAR, B.R.; NAKHLA, G. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. October 2015, p. 656–668, 2017.

- ELSAIED, M. ANDRES, Y.; BLEL, W.; GAD, A. Methane Production By Anaerobic Co-Digestion Of Sewage Sludge And Wheat Straw Under Mesophilic Conditions. **International journal of scientific & technology research**, v. 4, n. 06, 2015.
- ESCOBAR-ZEPEDA, A. et al. Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- ESKICIOGLU, C.; GHORBANI, M. Effect of inoculum / substrate ratio on mesophilic anaerobic digestion of bioethanol plant whole stillage in batch mode &. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1682–1687, 2011.
- ESSID, M. Trabelsi, K.; Jerbi, E.; Boubaker, S.; Gorgi, Y.; Ayed, K.; Azzouz, M. Parallel-META 2.0: Enhanced Metagenomic Data Analysis with Functional Annotation, High Performance Computing and Advanced Visualization. **Tunisie Medicale**, v. 81, n. 4, p. 270–272, 2003.
- FATIH DEMIRBAS, M.; BALAT, M.; BALAT, H. Biowastes-to-biofuels. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 4, p. 1815–1828, 2011.
- FIERRO, J.; MARTINEZ, E. J.; ROSAS, J. G.; FERNÁNDEZ, R. A.; LÓPEZ, R.; GOMEZ, X. Co-Digestion of Swine Manure and Crude Glycerine: Increasing Glycerine Ratio Results in Preferential Degradation of Labile Compounds. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 3, 2016.
- GHIMIRE, A.; FRUNZO, L.; PONTONI, L.; D'ANTONIO, G.; LENS, P.N.L.; GIOVANNI P.F. Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. **Journal of Environmental Management**, v. 152, p. 43–48, 2015a.
- GHIMIRE, A. FRUNZO, L.; PIROZZI, F.; TRABLY, E.; ESCUDIE, R.; LENS, P.N.L.; ESPOSITO, G. A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. **Applied Energy**, v. 144, p. 73–95, 2015b.
- GHIMIRE, A. SPOSITO, F.; FRUNZO, L.; TRABLY, E.; ESCUDIÉ, R.; PIROZZI, F.; LENS, P.N.L.; ESPOSITO, G. Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. **Waste Management**, v. 50, p. 55–64, 2016.
- GHOSH, D.; SOBRO, I. F.; HALLENBECK, P. C. Stoichiometric conversion of biodiesel derived crude glycerol to hydrogen: Response surface methodology study of the effects of light intensity and crude glycerol and glutamate concentration. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 154–160, 2012.
- GLANPRACHA, N.; ANNACHHATRE, A. P. Anaerobic co-digestion of cyanide containing cassava pulp with pig manure. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 112–121, 2016.
- GONZÁLEZ-PAJUELO, M. MEYNIAL-SALLES, I.; SOUCAILLE, P.; VASCONCELOS, I. Microbial Conversion of Glycerol to 1, 3-Propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, Clostridium Microbial Conversion of Glycerol to 1, 3-Propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, Clostridium butyricum VPI 3266, . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 96–101, 2006.

GUIMARÃES, J. L. WYPYCH, F. SAUL, C. K. RAMOS, L. P. SATYANARAYANA, K. G. Studies of the processing and characterization of corn starch and its composites with banana and sugarcane fibers from Brazil. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 130–138, 2010.

GUO, Y.; ZENG, W.; LI, N.; PENG, Y. Effect of electron acceptor on community structures of denitrifying polyphosphate accumulating organisms in anaerobic-anoxic (A2O) process using DNA based stable-isotope probing (DNA-SIP). **Chemical Engineering Journal**, v. 334, n. 100, p. 2039–2049, 2018.

GUWY, A. J.; DINSDALE, R. M.; KIM, J. R.; MASSANET-NICOLAU, J.; PREMIER, G. Fermentative biohydrogen production systems integration. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8534–8542, 2011.

HALLENBECK, P. C. AND BENEMANN, J. R. Biohydrogen- The microbial production of hydrogen fuel. **Biotechnology**, v. VII, [s.d.].

HALLENBECK, P. C. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. **Water Science Technology**, v. 52, n. 1–2, p. 21–9, 2005.

HALLENBECK, P. C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. Strategies for improving biological hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 1–9, 2012.

HALLENBECK, P. C.; BENEMANN, J. R. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1185–1193, 2002.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. **Journal of Environmental Management**, v. 95, n. SUPPL., p. S360–S364, 2012.

HERNÁNDEZ, M.; RODRÓGUEZ, M. Hydrogen production by anaerobic digestion of pig manure: Effect of operating conditions. **Renewable Energy**, v. 53, p. 187–192, 2013.

HU, B.; CHEN, S. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, n. 15 SPEC. ISS., p. 3266–3273, 2007.

HU, S.; Hu, S.; Guan, Y.; Wang, Y.; Han, H. Nano-magnetic catalyst KF/CaO-Fe₃O₄ for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 8, p. 2685–2690, 2011.

JARI OKSANEN, F. GUILLAUME BLANCHET, MICHAEL FRIENDLY, R. K. et al. Community Ecology Package. 2018.

JIMÉNEZ-CAREAGA, M. G. Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central compuesto. **Revista Varianza**, v. 11, p. 31–36, 2015.

JUNG, K.; Kim, D.; Kim, S.; Shin, H. Bioresource Technology Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8612–8620, 2011.

KAFLE, G. K.; KIM, S. H. Anaerobic treatment of apple waste with swine manure for

biogas production: Batch and continuous operation. **Applied Energy**, v. 103, p. 61–72, 2013.

KAN, E. Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation. **Renewable Energy**, v. 49, p. 227–231, 2013.

KANCHANASUTA, S.; SILLAPARASSAMEE, O. Enhancement of hydrogen and methane production from co-digestion of palm oil decanter cake and crude glycerol using two stage thermophilic and mesophilic fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 5, p. 3440–3446, 2017.

KARLSSON, A.; VALLIN, L. Effects of temperature , hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. v. 33, p. 953–962, 2008.

KESKIN, T.; ABO-HASHESH, M.; HALLENBECK, P. C. Photofermentative hydrogen production from wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8557–8568, 2011.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L.; The anaerobic digestion of solid organic waste. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1737–1744, 2011. KHURI, A. I.; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 2, n. 2, p. 128–149, 2010.

KIM, S. SEOL, E.; OH, Y.; WANG, G.Y.; PARK, S. Hydrogen production and metabolic flux analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7417–7427, 2009.

KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1821–1830, 2014.

KONDUSAMY, D.; KALAMDHAD, A. S. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1821–1830, 2014.

KONRAD, O. KOCH, F. F.; LUMI, M.; TONETTO, J.; BEZAMA, A. Potential of Biogas Production From Swine Manure Supplemented. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 5, p. 844–853, 2014.

KOTSYURBENKO, O. R. Trophic interactions in the methanogenic microbial community of low-temperature terrestrial ecosystems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n. 1, p. 3–13, 2005.

KRAKAT, N. WESTPHAL, A.; SCHMIDT, S.; SCHERER, P. Anaerobic digestion of renewable biomass: Thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1842–1850, 2010.

KRAUSE, M. J. *et al.* Effects of temperature and particle size on the biochemical methane potential of municipal solid waste components. **Waste Management**, v. 71, p.

25–30, 2017.

LABATUT, R. A.; ANGENENT, L. T.; SCOTT, N. R. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2255–2264, 2011.

LEE, H. S.; VERMAAS, W. F. J.; RITTMANN, B. E. Biological hydrogen production: Prospects and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 262–271, 2010.

LI, C.; CHAMPAGNE, P.; ANDERSON, B. C. Evaluating and modeling biogas production from municipal fat, oil, and grease and synthetic kitchen waste in anaerobic co-digestions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9471–9480, 2011.

LINDMARK, J. THORIN, E.; BEL FDHILA, R.; DAHLQUIST, E. Effects of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 1030–1047, 2014.

LIU, B.; LIU, L.; FENG, X. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 8, p. 3196–3205, 2013.

LIU, Z.; Zhang, C.; Lu, Y.; Wu, X.; Wang, L.; Wang, L.; Han, B.; Xing, X. States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 292–303, 2013b.

LÓPEZ-CARMONA, M. JIMÉNEZ-FERRER, G.; JONG, B. OCHOA-GAONA, S.; NAHED-TORAL, J. El sistema ganadero de montaña en la región norte-tzotzil de Chiapas, México. **Vet. Méx.**, v. 32, n. 2, p. 93–102, 2001.

LÓPEZ TORRES, M.; ESPINOSA LLORENS, M. DEL C. Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. **Waste Management**, v. 28, n. 11, p. 2229–2234, 2008.

ŁUKAJTIS, R.; HOŁOWACZ, I.; KUCHARSKA, K.; GLINKA, M.; RYBARCZYK, P.; PRZYJAZNY, A.; KAMIŃSKI, M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, n. April 2017, p. 665–694, 2018.

LUO, K.; YANG, Q.; YU, J.; LI, X.; YANG, G.; XIE, B.; YANG, F.; ZHENG, W.; ZENG, G. Combined effect of sodium dodecyl sulfate and enzyme on waste activated sludge hydrolysis and acidification. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7103–7110, 2011.

MAINTINGUER, S. I. *et al.* Fermentative hydrogen production by microbial consortium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4309–4317, 2008.

MANISH, S.; BANERJEE, R. Comparison of biohydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 1, p. 279–286, 2008.

MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 540–555, 2015.

MARCHAIM, U.; KRAUSE, C. Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 43, n. 3, p. 195–203, 1993.

- MARONE, A.; Varrone, C.; Fiocchetti, F.; Giussani, B.; Izzo, G.; Mentuccia, L.; Rosa, S.; Signorini, A. Optimization of substrate composition for biohydrogen production from buffalo slurry co-fermented with cheese whey and crude glycerol, using microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 1, p. 209–218, 2015.
- MATA-ALVAREZ, J.; DOSTA, J.; ROMERO-GÜIZA, M. S.; FONOLL, X.; PECES, M.; ASTALS, S. A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 412–427, 2014.
- MATHEWS, J.; WANG, G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 17, p. 7404–7416, 2009.
- MEHER KOTAY, S.; DAS, D. Biohydrogen as a renewable energy resource-Prospects and potentials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 1, p. 258–263, 2008.
- MIRON, Y. ZEEMAN, G.; VAN LIER, J B.; LETTINGA, G. The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems. **Water Research**, v. 34, n. 5, p. 1705–1713, 2000.
- MIURA, Y. Hydrogen production by biophotolysis based on microalgal photosynthesis. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 1–7, 1995.
- MONLAU, F.; Barakat, A.; Trably, E.; Dumas, C.; Steyer, J.; Carrère, H. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: Impact of structural features and pretreatment. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 260–322, 2013.
- MU, Y.; YU, H. Q.; WANG, G. Evaluation of three methods for enriching H₂-producing cultures from anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 947–953, 2007.
- NGHIEM, L. D.; NGUYEN, T. T.; MANASSA, P.; FITZGERALD, S.; DAWSON, M.; VIERBOOM, S. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol for on-demand biogas production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PA, p. 160–166, 2014.
- NTAIKOU, I.; ANTONOPOULOU, G.; LYBERATOS, G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 21–39, 2010.
- NUCHDANG, S.; PHALAKORNKULE, C. Anaerobic digestion of glycerol and co-digestion of glycerol and pig manure. **Journal of Environmental Management**, v. 101, p. 164–172, 2012.
- OGEJO, J. A.; LI, L. Enhancing biomethane production from flush dairy manure with turkey processing wastewater. **Applied Energy**, v. 87, n. 10, p. 3171–3177, 2010.
- OH, Y. K.; RAJ, S.; JUNG, G.; PARK, S. Current status of the metabolic engineering

of microorganisms for biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8357–8367, 2011.

OSTREM, K. Greening waste: anaerobic digestion for treating the organic fraction of municipal solid waste. **Department of Earth and Environmental Engineering Fu Foundation of School of Engineering and Applied Science, Columbia University**, n. The Earth Engineering Center and the Henry Krumb School of Mines, p. 1–59, 2004.

ÖZGÜR, EBRU, PEKSEL, B. Biohydrogen production from barley straw hydrolysate through sequential dark and photofermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 52, p. 14–20, 2013.

PALATSI, J.; VIÑAS, M.; GUIVERNAU, M.; FERNANDEZ, B.; FLOTATS, X. Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: Main process limitations and microbial community interactions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2219–2227, 2011.

PANICHNUMSIN, P.; NOPHARATANA, A.; AHRING, B.; CHAIPRASERT, P. Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1117–1124, 2010.

PANICHNUMSIN, P.; NOPHARATANA, A.; AHRING, B.; CHAIPRASERT, P. Enhanced Biomethanation in Co-Digestion of Cassava Pulp and Pig Manure Using A Two-Phase Anaerobic System. **Journal of Sustainable Energy & Environment**, v. 3, p. 73–79, 2012.

PARMAR, A. *et al.* Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10163–10172, 2011.

RAFIEENIA, R.; LAVAGNOLO, M. C.; PIVATO, A. Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: Current advances and future directions. **Waste Management**, v. 71, p. 734–748, 2018.

RAI, P. K.; SINGH, S. P. Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 44, p. 19957–19971, 2016.

REN, N. Q. GUO, W.; LIU, B.; CAO, G.; DING, J. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 16, p. 4318–4324, 2008.

REN21. **Renewables 2017: global status report**. [s.l: s.n.]. v. 72

ROBRA, S.; SERPA DA CRUZ, R.; DE OLIVEIRA, A. M.; NETO, J. A.; SANTOS, J. V. Generation of biogas using crude glycerin from biodiesel production as a supplement to cattle slurry. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 9, p. 1330–1335, 2010.

RUBIANO-LABRADOR, C. BAENA, S.; DÍAZ-CÁRDENAS, C.; PATEL, B. *Caloramator quimbayensis* sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic bacterium isolated from a terrestrial hot spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART4, p. 1396–1402, 2013.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013.

SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; SYDNEY, E. B.; LE BIHAN, Y.; BUELNA, G.; SOCCOL, C. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, n. 8, p. 6473–6490, 2012.

SHANMUGAM, P.; HORAN, N. J. Simple and rapid methods to evaluate methane potential and biomass yield for a range of mixed solid wastes. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 471–474, 2009.

SILES, J. A.; SANTOS, M.; PÉREZ, M.; MARTÍN, F. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 16, p. 6315–6321, 2010.

SINGH, L.; WAHID, Z. A. Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 21, p. 70–80, 2015.

SINHA, P.; PANDEY, A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 13, p. 7460–7478, 2011.

STONE, K. A.; HILLIARD, M. V.; HE, Q.; WANG, J. A mini review on bioreactor configurations and gas transfer enhancements for biochemical methane conversion. *Biochemical Engineering Journal*, v. 128, p. 83–92, 2017.

SU, H. *et al.* Combination of dark- and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 21, p. 8846–8853, 2009.

TENCA, A.; SCHIEVANO, A.; PERAZZOLO, F.; ADANI, F.; OBERTI, R. Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and vegetable waste: Maximizing stable production without pH control. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, p. 8582–8588, 2011.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. CHARACTERIZATION OF CRUDE GLYCEROL FROM BIODIESEL PRODUCTION FROM MULTIPLE FEEDSTOCKS. v. 22, n. 2, p. 261–265, 2006.

TIAN, H.; DUAN, N.; LIN, C.; LI, X.; ZHONG, M. Anaerobic co-digestion of kitchen waste and pig manure with different mixing ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 120, n. 1, p. 51–57, 2015.

URBANIEC, K.; BAKKER, R. R. Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation - A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 9, p. 3648–3658, 2015.

VALERIO, O. HORVATH, T.; POND, C.; MISRA, M.; MOHANTY, A. Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: Synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. *Industrial Crops and Products*, v. 78, p. 141–147, 2015.

VARRONE, C.; ROSA, S.; FIOCCHETTI, F.; GIUSSANI, B.; IZZO, G.; MASSINI, G.; MARONE, A.; SIGNORINI, A.; Wang, A. Statistical optimization of biohydrogen

and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 21, p. 16479–16488, 2012.

VIANA, M. B.; FREITAS, A. V.; LEITÃO, R. C.; PINTO, G. A.S.; SANTAELLA, S. T. Anaerobic digestion of crude glycerol: a review. *Environmental Technology Reviews*, v. 1, n. 1, p. 81–92, 2012.

WANG, F.; Zhou, H.; Meng, J.; Peng, X.; Jiang, L.; Sun, P.; Zhang, C.; Van Nostrand, J D.; Deng, Y.; He, Z.; Wu, L.; Zhou, J.; Xiao, X. GeoChip-based analysis of metabolic diversity of microbial communities at the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 12, p. 4840–4845, 2009.

WANG, J.; WAN, W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 2, p. 799–811, 2009.

WANG, L. et al. Enhanced biohydrogen production from waste activated sludge in combined strategy of chemical pretreatment and microbial electrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 23, p. 11913–11919, 2014a.

WANG, L.; WENZONG L.; LINGLING K.; CHUNXUE Y.; AIJUAN Z.; AIJIE W. Enhanced biohydrogen production from waste activated sludge in combined strategy of chemical pretreatment and microbial electrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 23, p. 11913–11919, 2014. WANG, X. et al. Effects of temperature and Carbon-Nitrogen (C/N) ratio on the performance of anaerobic co-digestion of dairy manure, chicken manure and rice straw: Focusing on ammonia inhibition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–7, 2014b.

WANG, X.; ZHAO, Y. A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 1, p. 245–254, 2009.

WANG, Y. Y.; AI, P.; HU, C.; ZHANG, Y. Effects of various pretreatment methods of anaerobic mixed microflora on biohydrogen production and the fermentation pathway of glucose. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 1, p. 390–396, 2011b.

WARD, A. J. *et al.* Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 7928–7940, 2008.

WEILAND, P. Biogas production: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 849–860, 2010.

WILLKE, T.; VORLOP, K. Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 9, p. 831–840, 2008.

WONG, Y. M.; WU, T. Y.; JUAN, J. C. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 471–482, 2014.

XU, R. ZHANG, K.; LIU, P.; KHAN, A.; XIONG, J.; TIAN, F.; LI, X. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 1119–1127, 2017.

- YAMADA, T.; IMACHI, H.; OHASHI, A.; HARADA, H.; HANADA, S.; KAMAGATA, Y.; SEKIGUCHI, Y. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2299–2306, 2007.
- YENIGÜN, O.; DEMIREL, B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5–6, p. 901–911, 2013.
- YU, J.; TAKAHASHI, P. Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v. 1, p. 79–89, 2007.
- YU, Z. GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; SCHANBACHER, F. L.; MORRISON, M. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 889–893, 2008.
- YUSOF, T. R. T.; MAN, H.; RAHMAN, N.; HAFID, H. Optimization of Methane Gas Production From Co-digestion of Food waste and Poultry Manure Using Artificial Neural Network and Response Surface Methodology. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 7, p. 27–37, 2014.
- ZENG, S. LI, J.; ZENG, Y.; LIU, W.; WANG, Y.; ZHENG, Y.; LIU, C.; ZHAO, Y. Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, n. 1–3, p. 89–93, 2010.
- ZHANG, G. L. MA, B.; XU, X.; LI, C.; WANG, L. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 3, p. 256–260, 2007.
- ZHANG, T. et al. Biogas Production by Co-Digestion of Goat Manure with Three Crop Residues. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–7, 2013.
- ZHANG, T.; LIU, L.; SONG, Z.; REN, G.; FENG, Y.; HAN, X.; YANG, G. Biogas Production by Co-Digestion of Goat Manure with Three Crop Residues. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–7, 2013.
- ZHU, M. M.; LAWMAN, P. D.; CAMERON, D. C. Improving 1,3-Propanediol Production from Glycerol in a Metabolically Engineered *Escherichia coli* by Reducing Accumulation of sn-Glycerol-3-phosphate. **Plasmid**, p. 694–699, 2002.
- EPE -Empresa de Pesquisa Energética. Balanço Energético Nacional 2015, ano base 2014. rio de Janeiro 2015. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2015.pdf. Acesso em 20/02/2018.
- FERNÁNDEZ G. L. Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. Tesis de Doctorado. Universidad de Cádiz. Cádiz, España. 442 p, 2008.
- DEUBLEIN D. AND SEINHAUSER A. Biogas from waste and renewable resources,

an introduction. Wiley-VCH Editorial. Germany. 450 pp, 2008.

MARTÍ N. Estudio del proceso de digestión anaerobia para optimizar la recuperación de fósforo en EDAR. Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad Politécnica de Valencia. España. 169 p, 2005. Rittmann BE, McCarty PL. Environmental Biotechnology: Principles and Applications, New York: McGraw Hill. 126 p, 2001.

VIGUERAS S. Digestión anaerobia en una y dos etapas de lodos residuales secundarios pretratados químicamente. Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F. 98 p, 2002.

MADIGAN M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. Brock Biology of microorganisms. 8th Edition. Prentice may International Editorial. 1061 pp, 1998.

DE JUANA J. M., DE FRANCISCO G. A., FERNÁNDEZ G. J., SANTOS G. F., HERRERO G. M., CRESPO M. A. Energías renovables para el desarrollo. 1er Edición. Editorial Paraninfo. Madrid, España. 336 pp, 2004.

CHENG, YAY II. Biomass to renewable energy processes. Editorial Taylor and Francis Group, LLC. USA, 2010.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Meat consumption in Brazil. Disponível in: <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>. Acesso em: 01 de junho de 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Receita das exportações de carne suína cresce 38,4% em outubro, (2019). Disponível em: <http://abpa-br.com.br/noticia/receita-das-exportacoes-de-carne-suina-cresce-384-em-outubro-2942>.

MCMURDIE, P. J., & HOLMES, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

PAL, C., BENGTSSON-PALME, J., KRISTIANSSON, E., & LARSSON, D. G. J. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. BMC Genomics, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>

ESCOBAR-ZEPEDA, A., DE LEÓN, A. V. P., & SANCHEZ-FLORES, A. (2015). The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, 6(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00348>

**Termo de Autorização para disponibilização e licenciamento de Dissertações e Teses
e Monografias de especialização no Repositório Institucional da UFVJM**

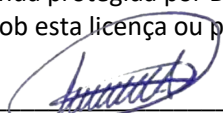
1 IDENTIFICAÇÃO		
Autor: Fidel Alejandro Aguilar Aguilar		
E-mail: falexaguilar@gmail.com		Telefones:
Matrícula: 20151890005	CPF:	RG:

2 TRABALHO		
<input type="checkbox"/> Dissertação	<input checked="" type="checkbox"/> Tese	<input type="checkbox"/> Monografia de especialização
Título: Avaliação da produção de biometano e bio-hidrogênio a partir de glicerol bruto da cadeia produtiva do biodiesel e de dejetos da suinocultura		
Palavras-chave: Fermentação Escura, Dejetos Suínos, Glicerol Bruto, Planejamento Experimental, Codigestão Anaeróbia, Biocombustíveis		
Programa de pós-graduação: Biocombustíveis		
Data da defesa: 27/08/2019	<input checked="" type="checkbox"/> Aberta	<input type="checkbox"/> Fechada ¹
Orientador: Alexandre Soares dos Santos	E-mail: alexandre.soares@ufvjm.edu.br	
Coorientador(es): Lílian de Araújo Pantoja, Joseph Sebastian Pathiyamattom		

3 INFORMAÇÕES DE ACESSO		
Liberação para disponibilização? <input checked="" type="checkbox"/> Sim ^{2,3} <input type="checkbox"/> Não ⁴		
Trabalho confidencial <input type="checkbox"/> Sim ^{4,5} <input checked="" type="checkbox"/> Não		
¹ Deve ser acompanhado da Ata ou Declaração de sigilo da defesa.		
² Os metadados dos trabalhos ficarão sempre disponíveis.		
³ Toda dissertação e tese produzida pela UFVJM deve ser divulgada conforme Portaria Capes nº 3 de 15 de fevereiro de 2006 e Resolução própria do RI/UFVJM.		
⁴ Todo trabalho confidencial deve acompanhar justificativa, e data limite ou período de restrição.		
⁵ Caso necessário o tempo data/período poderão ser prorrogados mediante avaliação do CITec/UFVJM.		

4 LICENÇA
Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação supracitada, de acordo com a Lei nº 9610/98, autorizo a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri a disponibilizar gratuitamente, sem ressarcimento dos direitos autorais, conforme permissões assinadas acima, do documento, em meio eletrônico, no Repositório Institucional da UFVJM, no formato especificado ² , para fins de leitura, impressão e/ou download pela Internet, a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade, a partir desta data. Autorizo ao SisBi/UFVJM disponibilizar a obra, gratuitamente, de acordo com a licença pública <i>Creative Commons Licença 4.0 Unported</i> ¹ por mim declarada sob as seguintes condições: não permite comercialização, não permite modificações.

A obra continua protegida por Direito Autoral e/ou por outras leis aplicáveis. Qualquer uso da obra que não o autorizado sob esta licença ou pela legislação autoral é proibido.


 Assinatura do autor
 Diamantina MG, Brasil
17 / 08 / 2020
 Local
 Data

Data da entrega do documento no SisBi/UFVJM: ____/____/____. Recebido por: _____